



CSA085048

Organizacion y
Digitalizacion CSA Ltda

BT

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

PCT

INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

09-556332

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO ANTICUERPOS ANTI-FACTOR D HUMANIZADOS

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE GENENTECH, INC.

DOMICILIO SAN FRANCISCO, CA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. SANTAFE DE BOGOTÀ, D.C.

PETITORIO

AS: 110.500



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-055632-00000-0000

Fecha: 2009-05-29 17:04:39 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 166

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.**

Dirección: 1 Dna Way, South San Francisco,
California 94080, Estados Unidos de América
Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de
América
Lugar de Constitución: Estados Unidos de América
Teléfono: Fax:
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO**

Dirección: Cra. 7 No. 71-21 Torre B - Piso 4,
Bogotá, Colombia.

Teléfono: 744-2200 Fax: 742-2200
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 80.410.337 TP 57492

4

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: Herren ~~WU~~, Sanjaya ~~SINGH~~, Sek Chung ~~FUNG~~, Ling-ling ~~AN~~, Henry B.
LOWMAN, Robert F. ~~KELLEY~~.

Dirección: c/o Genenotech, Inc., 1 Dna Way, South San Francisco, California 94080, US;
c/o Genenotech, Inc., 1 Dna Way, South San Francisco, California 94080, US; c/o
Genenotech, Inc., 1 Dna Way, South San Francisco, California 94080, US; c/o Genenotech,
Inc., 1 Dna Way, South San Francisco, California 94080, US; 400 San Juan Avenue, El
Granada, California 94018, US; 1029 San Felipe Avenue, San Bruno, California 94066, US
(Respectivamente).

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/083172
Publicación Internacional No WO 2008/055206 A3

Fecha 31-10-2007
Fecha 08-05-2008

6 Título (54): ANTICUERPOS ANTI-FACTOR D HUMANIZADOS

7 Clasificación Internacional (51): _____

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐

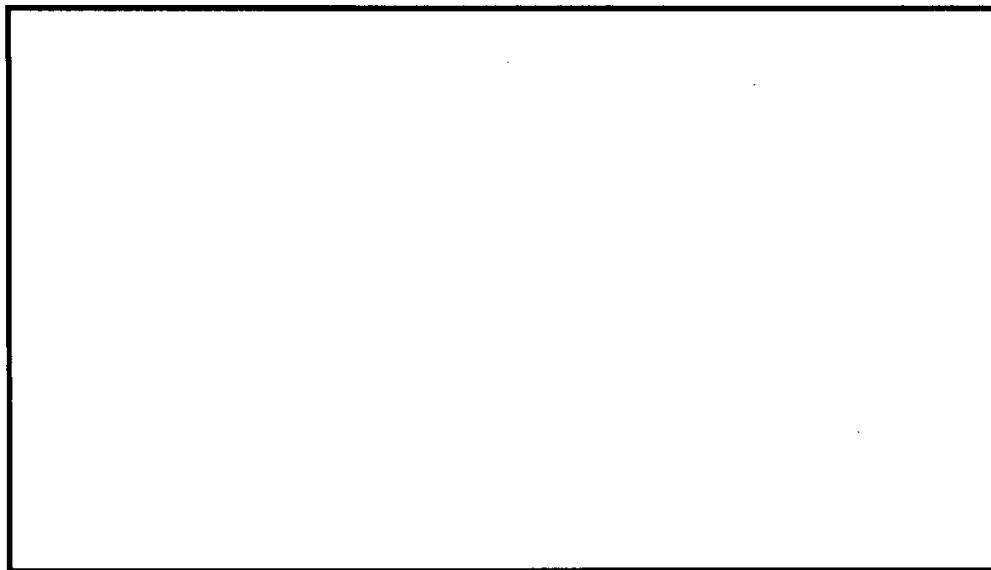
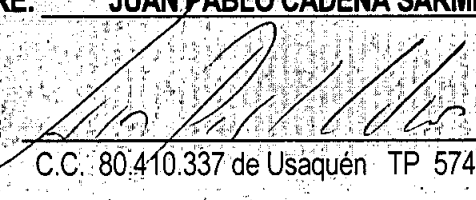
(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	02-11-2006	60/856,505

9 Comprobante de pago No. 09-27.125; 09-31.048; 09-4.857

Fecha 29-05-2009

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

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$ 540.000
- ☒ Documento que acredite 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.
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de Reivindicaciones adicionales \$550.000 (22*\$25.000)

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:**12** Solicito la concesión de la patente,**NOMBRE:** JUAN PABLO CADENA SARMIENTO**FIRMA:** 

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

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

110 500

NTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

IAL DE CAJA : 09 - 27,125
: ABRIL 7 DE 2009

***** C O N S I

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-055632- -00000-0000

Fecha: 2009-05-29 17:04:39 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 168

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA 062754387	106432351	07/04/2009	22,458,000.00

***** C O N C E P T O *****

ISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
05-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
	TOTAL :	\$ 540,000.00

IENTOS CUARENTA MIL PESOS

CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

NO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
STITUIDA POR NINGUN RECIBO.

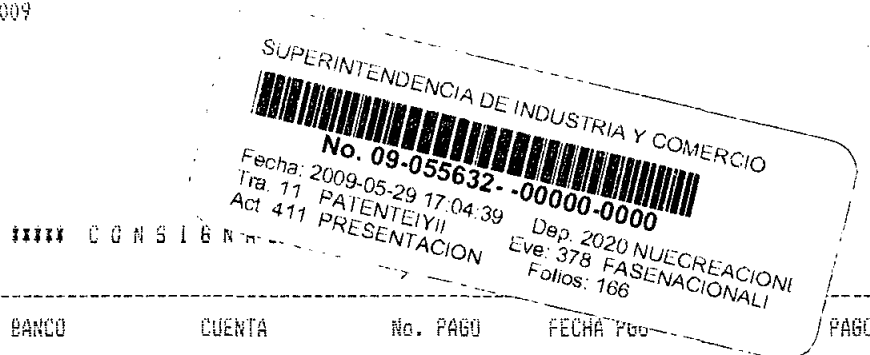
110 500 4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 31,048

CHA : ABRIL 24 DE 2009



POSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	PAGO
IGARO & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	104946063	22/04/2009	25,421,080.00

CONCEPTO

NT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	500,000.00
	TOTAL :	500,000.00

N: QUINIENTOS MIL PESOS

SPONSABLE : _____

CIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

TA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA

110 500 ✓

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 4,857
FECHA : ENERO 21 DE 2009

***** CONSIGNA

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA			
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	105762016	20/01/2009	37,982,200.00



***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO	
1	50005-01-09	DTOS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	998 VALOR COMPLEMENTO TARIFA A#0 ANTR	50,000.00
TOTAL :				\$ 50,000.00

SON: CINCUENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
8 May 2008 (08.05.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/055206 A3

(51) International Patent Classification:

C07K 16/36 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)400 San Juan Avenue, El Granada, California 94018 (US).
KELLEY, Robert, F. [US/US]; 1029 San Felipe Avenue,
San Bruno, California 94066 (US).

(21) International Application Number:

PCT/US2007/083172

(74) Agent: **GEORGE, Nikolaos C.**; Jones Day, 222 East 41st
Street, New York, NY 10017 (US).

(22) International Filing Date: 31 October 2007 (31.10.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/856,505 2 November 2006 (02.11.2006) US

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

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **WU, Herren**
[US/US]; c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San
Francisco, California 94080 (US). **SINGH, Sanjaya**
[US/US]; c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San
Francisco, California 94080 (US). **FUNG, Sek, Chung**
[US/US]; c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San
Francisco, California 94080 (US). **AN, Ling-ling** [US/US];
c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco,
California 94080 (US). **LOWMAN, Henry, B.** [US/US];(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL,
PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, MT, 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).

[Continued on next page]

(54) Title: HUMANIZED ANTI-FACTOR D ANTIBODIES

Optimized Anti-FD HuFabs Inhibit AP Hemolysis

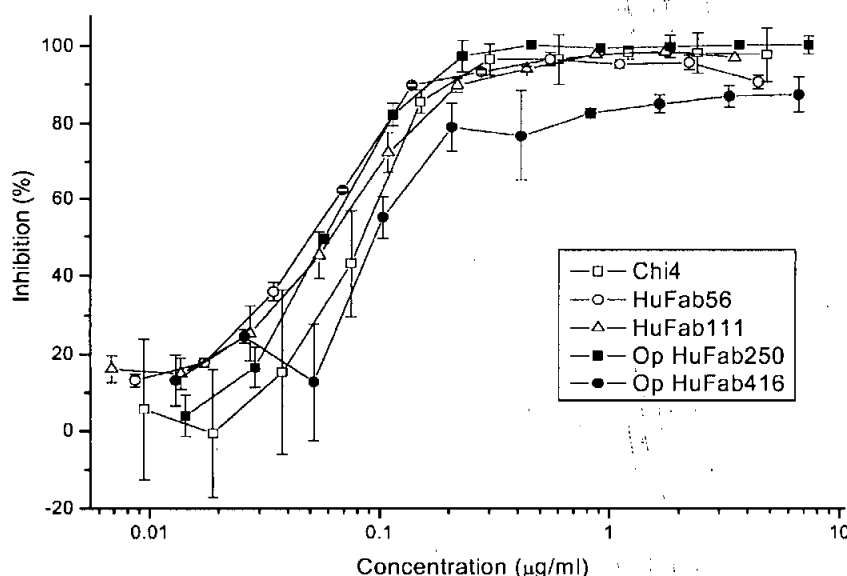


FIG. 6

(57) Abstract: The invention relates to humanized anti-human Factor D monoclonal antibodies, their nucleic acid and amino acid sequences, the cells and vectors that harbor these antibodies and their use in the preparation of compositions and medicaments for treatment of diseases and disorders associated with excessive or uncontrolled complement activation. These antibodies are useful for diagnostics, prophylaxis and treatment of disease.

7

WO 2008/055206 A3



Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

— with information concerning authorization of rectification of an obvious mistake under Rule 91.1

(88) Date of publication of the international search report:
4 September 2008

(15) Information about Correction:
Previous Correction:
see Notice of 17 July 2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/083172

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/36 A61P37/00 A61P27/02		
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		
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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TANHEHCO E J ET AL: "The anti-factor D antibody, MAb 166-32, inhibits the alternative pathway of the human complement system." TRANSPLANTATION PROCEEDINGS AUG 1999, vol. 31, no. 5, August 1999 (1999-08), pages 2168-2171, XP002454359 ISSN: 0041-1345 page 2168, left-hand column page 2170, right-hand column ----- -/--	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 referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 June 2008		Date of mailing of the international search report 26/06/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo.nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Le Flao, Katell

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/083172

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HARBOE M ET AL: "The quantitative role of alternative pathway amplification in classical pathway induced terminal complement activation." CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY DEC 2004, vol. 138, no. 3, December 2004 (2004-12), pages 439-446, XP002454358 ISSN: 0009-9104 abstract page 445, left-hand column	1-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/083172

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 29 and 30 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

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

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
8 de Mayo de 2008 (08.05.2008)

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2008/055206 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷:
C07K 16/36 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

South San Francisco, California 94080 (US).
LOWMAN, Henry, B. [US/US]; 400 San Juan Avenue,
El Granada, California 94018 (US). **KELLEY, Robert, F.**
[US/US]; 1029 San Felipe Avenue, San Bruno,
California 94066 (US).

(21) No. Solicitud Internacional: PCT/US2007/083172

(22) Fecha de Presentación Internacional:
31 de octubre de 2007 (31.10.2007)

(74) Agente: **GEORGE, Nikolaos C.**; Jones Day, 222 East
41st Street, New York, NY 10017 (US).

(25) Idioma de Presentación: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Datos relativos a la Prioridad:
60/856,505 2 de noviembre de 2006 (02.11.2006) US

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

(72) Inventores, e

(75) Inventores/Solicitantes (para US únicamente): **WU,**
Herren [US/US]; c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way,
South San Francisco, California 94080 (US). **SINGH,**
Sanjaya [US/US]; c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way,
South San Francisco, California 94080 (US). **FUNG,**
Sek, Chung [US/US]; c/o Genentech, Inc., 1 DNA
Way, South San Francisco, California 94080 (US). **AN,**
Ling-ling [US/US]; c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way,

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

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

[Continúa en la página siguiente]

(54) Título: ANTICUERPOS ANTI-FACTOR D HUMANIZADOS

HuFabs Anti-FD Optimizados Inhiben Hemólisis AP

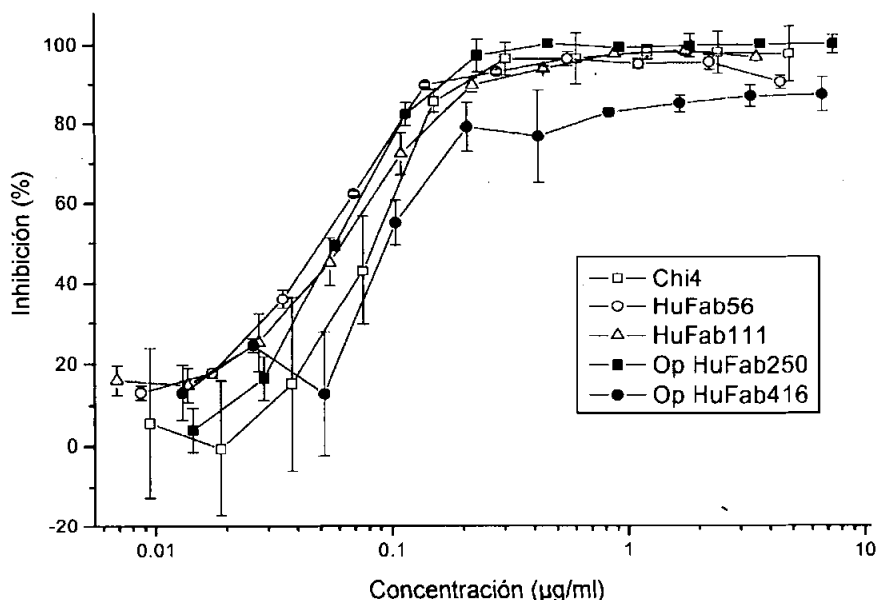


FIG. 6

(57) Extracto: La invención se refiere a anticuerpos monoclonales anti-Factor D humano humanizados, sus secuencias de aminoácidos y ácido nucleico, las células y vectores que albergan estos anticuerpos y su uso en la preparación de composiciones y medicamentos para el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con una activación excesiva e incontrolada de complemento. Estos anticuerpos son útiles para el diagnóstico, profilaxis y tratamiento de enfermedades.



Publicado:

- con informe internacional de búsqueda
- antes del vencimiento del tiempo límite para modificar las reivindicaciones y para volverse a publicar en el caso de recibo de modificaciones.
- con parte del listado de secuencias de la descripción publicada separadamente en formato electrónico y disponible, previa solicitud, de la Oficina Internacional

- con información concerniente a la autorización de rectificación de un error obvio bajo la Regla 91.1

(48) Fecha de publicación del informe de búsqueda internacional:

4 de septiembre de 2008

(15) Información sobre la modificación

ver comunicación del 17 de julio de 2008

Anticuerpos Anti-Factor D Humanizados

Arte Previo de la Invención

[0001] El sistema de complemento juega un papel central en la depuración de complejos inmunitarios y la respuesta inmunitaria a agentes infecciosos, antígenos externos, células infectadas con virus y células neoplásicas. No obstante, el complemento se encuentra también implicado en la inflamación patológica y en las enfermedades autoinmunitarias. Por consiguiente, la inhibición de la activación excesiva o incontrolada de la cascada del complemento podría aportar un beneficio clínico a pacientes con tales enfermedades y afecciones.

[0002] El sistema de complemento comprende dos vías distintas de activación, denominadas las vías clásica y alternativa (V.M. Holers, In *Clinical Immunology: Principles and Practice*, ed. R.R. Rich, Mosby Press; 1996, 363-391). La vía clásica es una cascada dependiente de calcio/magnesio, la cual se activa normalmente por la formación de complejos antígeno-anticuerpo. La vía alternativa es una cascada dependiente de magnesio, que se activa por la deposición y activación de C3 en ciertas superficies susceptibles (por ejemplo, polisacáridos de la pared celular de levadura y bacterias, y ciertos materiales bio-poliméricos). La activación de la vía del complemento genera fragmentos biológicamente activos de proteínas de complemento, por ejemplo C3a, C4a y C5a anafilatoxinas y complejos de ataque de membrana C5b-9 (MAC – *membrane attack complexes*), que median actividades inflamatorias, las cuales involucran quimiotaxis leucocitaria, activación de macrófagos, neutrófilos, plaquetas, mastocitos y células endoteliales, permeabilidad vascular, citólisis y lesión tisular.

[0003] El Factor D es una serina proteasa altamente específica, esencial para la activación de la vía de complemento alternativa. Segmenta

el factor B ligado a C3b, generando la enzima C3b/Bb, la cual es el componente activo de las C3/C5 convertasas de la vía alternativa. El Factor D puede ser una diana apropiada para inhibición, puesto que su concentración plasmática en humanos es muy baja (1.8 µg/ml), y se ha demostrado que es la enzima limitante para la activación de la vía de complemento alternativa (P.H. Lesavre and H.J. Müller-Eberhard. *J. Exp. Med.*, 1978; 148: 1498-1510; J.E. Volanakis et al., *New Eng. J. Med.*, 1985; 312: 395-401).

[0004] Se ha demostrado que la regulación por disminución de la activación del complemento es efectiva en tratar varias indicaciones patológicas en modelos animales y en estudios *ex vivo*, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico y glomerulonefritis (Y. Wang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 1996, 93: 8563-8568), artritis reumatoide (Y. Wang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1995; 92: 8955-8959), bypass cardiopulmonar y hemodiálisis (C.S. Rinder, *J. Clin. Invest.*, 1995; 96: 1564-1572), rechazo hiperagudo en transplante de órganos (T.J. Kroshus et al., *Transplantation*, 1995; 60: 1194-1202), infarto del miocardio (J. W. Homeister et al., *J. Immunol.*, 1993; 150: 1055-1064; H.F. Weisman et al., *Science*, 1990; 249: 146-151), lesión por reperfusión (E.A. Amsterdam et al., *Am. J. Physiol.*, 1995; 268: H448-H457), y síndrome disneico agudo del adulto (R. Rabinovici et al., *J. Immunol.*, 1992; 149: 1744-1750). Además, otras afecciones inflamatorias y enfermedades complejas autoinmunitarias/inmunitarias están también estrechamente asociadas con la activación del complemento (V.M. Holers, *ibid.*, B.P. Morgan. *Eur. J. Clin. Invest.*, 1994; 24: 219-228), incluida la lesión térmica, asma grave, choque anafiláctico, inflamación intestinal, urticaria, angioedema, vasculitis, esclerosis múltiple, miastenia grave, glomerulonefritis membranoproliferativa y síndrome de Sjögren.

[0005] Existe una necesidad de terapéutica con anticuerpos en el campo de los trastornos mediados por complemento, y los anticuerpos

humanizados de la presente invención proveen anticuerpos de alta afinidad útiles para satisfacer esta necesidad.

Sumario de la Invención

[0006] La presente invención se refiere generalmente a anticuerpos que comprenden las secuencias de dominio variable de cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo murino 166-32, el cual es un anticuerpo capaz de inhibir las actividades biológicas asociadas con el Factor D. Por ejemplo, con una concentración de 18 µg/ml (equivalente a alrededor de 1.5 veces la concentración molar del factor D humano en la sangre; relación molar del anticuerpo anti-Factor D a Factor D de alrededor de 1.5:1), puede observarse una inhibición significativa de la actividad de complemento alternativa por el anticuerpo (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 6,956,107)

[0007] La presente invención se refiere igualmente a anticuerpos humanizados de MAb 166-32 murino. La invención incluye las secuencias de aminoácidos de la cadena variable ligera y pesada de los anticuerpos y sus correspondientes secuencias de ácido nucleico. Otra incorporación de la invención incluye las secuencias CDR de estos anticuerpos.

[0008] Otra incorporación de la presente invención incluye composiciones que comprenden un anticuerpo de la invención. En otra incorporación, la invención provee líneas de células y vectores que albergan las secuencias de anticuerpo de la presente invención. En un aspecto, la invención incluye un método de elaborar y usar anticuerpos y composiciones de la invención.

[0009] Otra incorporación de la presente invención es el uso de estos anticuerpos humanizados para la preparación de un medicamento o composición para el tratamiento de trastornos asociados con una activación

de complemento excesiva o incontrolada. Éstos incluyen activación de complemento durante operaciones de bypass cardiopulmonar; activación de complemento debida a isquemia-reperfusión luego de infarto agudo del miocardio, aneurisma, apoplejía, choque hemorrágico, lesión por aplastamiento, insuficiencia multiorgánica, choque hipobolémico, isquemia intestinal u otros episodios causantes de isquemia. Se ha demostrado así mismo que la activación de complemento está asociada con enfermedades inflamatorias tales como quemaduras graves, endotoxemia, choque septicémico, síndrome disneico del adulto, hemodiálisis; choque anafiláctico, asma grave, angioedema, enfermedad de Crohn, anemia drepanocítica, glomerulonefritis pos-estreptocócica y pancreatitis. El trastorno puede ser el resultado de una reacción adversa a medicamentos, alergia por medicamentos, síndrome de fuga vascular inducida por IL-2 o alergia a medio de contraste radiográfico. Incluye además enfermedad autoinmunitaria tal como lupus eritematoso sistémico, miastenia grave, artritis reumatoide, enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple. La activación de complemento se asocia igualmente con el rechazo de transplantes. La activación de complemento se asocia también con enfermedades oculares tales como degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética.

Breve Descripción de las Figuras

[00010] Figuras 1A y 1B ilustran la secuencia de aminoácidos de la Cadena Pesada Variable (Figura 1B) y la Cadena Ligera Variable (Figura 1B) I del MAb 166-32 Murino.

[00011] Figuras 2A y 2B ilustran la secuencia de ácido nucleico la Cadena Pesada Variable (Figura 2A) y la Cadena Ligera Variable (Figura 2B) del MAb 166-32 Murino.

[00012] Figura 3 ilustra la comparación de la cadena pesada del MAb

166-32 murino.

[00013] Figura 4 ilustra la comparación de la cadena ligera del MAb 166-32 murino.

[00014] Figura 5 ilustra las secuencias de aminoácidos de la Cadena Pesada Variable y la Cadena Ligera Variable para cada clon de anticuerpo humanizado #56, #111, #250 y #416.

[00015] Figura 6 ilustra los resultados del análisis hemolítico para el clon FAB del anticuerpo humanizado #56, #111, # 250 y #416.

[00016] Figura 7 ilustra la inhibición de la actividad del complemento alternativa por clones Fab del anticuerpo humanizado #56, #111, # 250 y #416.

[00017] Figura 8A-B (estructuras de consenso pesadas variables (VH)) y Figura 9A-B (estructuras de consenso ligeras variables (VL)) ilustran secuencias de estructuras de consenso humanas de aceptor ejemplares, que pueden usarse en la práctica de la presente invención con identificadores de secuencia en la siguiente forma: (Figura 8A-B) estructura de consenso subgrupo I VH humana menos CDRs de Kabat (SEQ ID NO: 28), estructura de consenso subgrupo VH humano menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs: 29-31), estructura de consenso subgrupo II VH humano menos CDRs de Kabat (SEQ ID NO: 32), estructura de consenso subgrupo II VH humano menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs: 33-35), estructura de consenso subgrupo III VH humano menos CDRs de Kabat (SEQ ID NO: 36), estructura de consenso subgrupo III VH humano menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs: 37-39), estructura de consenso subgrupo VII VH humano menos CDRs de Kabat (SEQ ID NO: 55), estructura de consenso subgrupo VII VH humano menos regiones

hipervariables extendidas (SEQ ID NOs: 56-58), estructura de aceptor VH humano menos CDRs de Kabat (SEQ ID NO: 40), estructura de aceptor VH humano menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs: 41-42), estructura de aceptor 2 VH humano menos CDRs de Kabat (SEQ ID NO: 43) y estructura de aceptor 2 VH humano menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs: 44-46) y (Figura 9A-B) estructura de consenso subgrupo I kappa VL humano (SEQ ID NO: 47), estructura de consenso subgrupo II kappa VL humano (SEQ ID NO: 48), estructura de consenso subgrupo III kappa humano (SEQ ID NO: 49) y estructura de consenso subgrupo IV kappa humano (SEQ ID NO: 50).

Descripción Detallada de la Invención

Definiciones

[00018] Los términos empleados a todo lo largo de esta solicitud tienen que interpretarse con el significado típico y ordinario para los expertos en el arte. No obstante, los solicitantes desean que a los términos siguientes se les dé la definición particular como se indica a continuación.

[00019] La expresión "sustancialmente idéntica" con respecto a una secuencia polipeptídica de cadena de anticuerpo puede interpretarse como una cadena de anticuerpo que exhibe por lo menos 70%, u 80%, o 90% o 95% de identidad de secuencia con la secuencia polipeptídica de referencia. El término con respecto a una secuencia de ácido nucleico puede interpretarse como una secuencia de nucleótidos que exhibe por lo menos alrededor de 85%, o 90%, o 95% o 97% de identidad de secuencia con la secuencias de ácido nucleico de referencia.

[00020] El término "identidad" u "homología" se interpretará como significativo del porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata, que son idénticos con el residuo de una secuencia correspondiente con la cual se compara, luego de alinear las secuencias e

introducir vacíos ("*gaps*"), si es necesario, para lograr la identidad porcentual máxima para toda la secuencia, y sin considerar cualesquiera sustituciones conservadoras como parte de la identidad de secuencia. No se interpretará que las extensiones N- o C-terminales ni las inserciones reducen la identidad u homología. Métodos y programas de computador para el alineamiento son bien conocidos en el arte. La identidad de secuencia puede medirse usando software de análisis de secuencias.

[00021] El término "anticuerpo" se emplea en el sentido más amplio y, específicamente, cubre anticuerpos monoclonales (incluidos los anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales y anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos). Los anticuerpos (Abs) y las inmunoglobulinas (Igs) son glucoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras los anticuerpos exhiben especificidad de unión a una diana específica, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas tipo anticuerpo, las cuales carecen de especificidad de diana. Los anticuerpos naturales y las inmunoglobulinas son usualmente glucoproteínas heterotetraméricas de alrededor de 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido por un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo.

[00022] Tal como se emplea en esta especificación, "anticuerpo de Factor D anti-humano" significa un anticuerpo que se une específicamente al Factor D humano de tal manera que inhibe o reduce sustancialmente la activación de complemento.

[00023] El término "variable", en el contexto de dominio variable de anticuerpos, se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren extensivamente en secuencia entre anticuerpos y se

29

utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su diana particular. No obstante, la variabilidad no está uniformemente distribuida a través de los dominios variables de los anticuerpos. Ésta se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (CDRs), también conocidas como regiones hipervariables (HVRs), tanto en los dominios variables de cadena pesada como en los de cadena ligera. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan la estructura (FR). Los dominios variables de cadenas naturales pesadas y ligeras comprenden cada uno cuatro regiones FR que adoptan en gran medida una configuración de hoja β (" *β -sheet configuration*"), conectada por tres CDRs, que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de la hoja β . Las CDRs en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones FR y, con las CDRs de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a diana de anticuerpos (véase Kabat *et al.*). Tal como se emplea en esta especificación, la numeración de residuos de aminoácidos de las inmunoglobulinas se realiza de acuerdo con el sistema de numeración de residuos de aminoácidos de inmunoglobulinas de Kabat *et al.*, (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institute of Health, Bethesda, MD. 1987), a menos que se indique lo contrario.

[00024] El término "región hipervariable", "HVR", o "HV", cuando se emplea en esta solicitud, se refiere a las regiones de un dominio variable de un anticuerpo que son hipervariables en bucles definidos estructuralmente de secuencia y/o forma. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en el VH (H1, H2, H3), y tres en el VL (L1, L2, L3). En esta especificación se encuentran comprendidos y se emplean un número de delineamientos de regiones hipervariables. Las Regiones Determinantes de Complementariedad de Kabat (CDRs) se basan en la variabilidad de secuencia y son las más comúnmente empleadas (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia, en

21

cambio, se refiere a la localización de los bucles estructurales (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las regiones hipervariables del AbM representan un compromiso entre las CDRs de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se utilizan por el Oxford Molecular's AbM antibody modeling software. Las regiones hipervariables de "contacto" se basan en el análisis de las estructuras cristalinas completas disponibles. Los residuos de cada una de estas regiones hipervariables se anotan a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
----	-----	---	-----	-----
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Numeración de Kabat)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Numeración de Chothia)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[00025] Las regiones hipervariables pueden comprender "regiones hipervariables extendidas", como sigue: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en el VH. Los residuos del dominio variable se numeran de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra* para cada una de estas definiciones.

[00026] "Estructura" o residuos "FR" son aquellos residuos de dominio variable distintos de los residuos de región hipervariable o los residuos CDR definidos en esta especificación.

[00027] El término "numeración de residuos de dominio variable

22

como en Kabat" o "numeración de posiciones de aminoácidos como en Kabat", y sus variaciones, se refiere al sistema de numeración utilizado para dominios variables de cadena pesada o para dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Usando este sistema de numeración, la secuencia lineal actual de aminoácidos puede contener pocos aminoácidos o aminoácidos adicionales que correspondan a un acortamiento de, o una inserción en, una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un solo inserto de aminoácidos (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, los residuos 82a, 82b, y 82c, etc., de acuerdo con Kabat) después del residuo 82 de la FR de cadena pesada. La numeración de Kabat de los residuos puede determinarse para un anticuerpo dado mediante alineación en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada "estándar" de Kabat.

[00028] El sistema de numeración de Kabat se usa generalmente cuando se hace referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente, residuos 1-107 de la cadena ligera y residuos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). El "sistema de numeración UE" o "índice UE" se emplea generalmente cuando se hace referencia a un residuo en una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice UE divulgado en Kabat *et al.*, supra; la región bisagra en el dominio constante de la cadena pesada es aproximadamente los residuos 216-230 (numeración EU) de la cadena pesada). El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo IgG1 EU humano. A menos que se indique lo contrario en esta especificación, las referencias a números de residuos en el dominio variable de anticuerpos significa la

23

numeración de residuos por el sistema de numeración de Kabat. A menos que se indique lo contrario en esta especificación, las referencias a números de residuos en el dominio constante de anticuerpos significa la numeración de residuos por el sistema de numeración EU (por ejemplo, véase Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 60/640,323, Cifras para la numeración EU).

[00029] El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la unión a la diana o región variable. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv. La expresión "fragmento funcional o análogo" de un anticuerpo es un compuesto que tiene actividad biológica cualitativa en común con un anticuerpo de longitud completa. Por ejemplo, un fragmento funcional o análogo de un anticuerpo de Factor D anti-humano es uno que puede unirse al Factor D de tal manera que impida o reduzca sustancialmente la activación de complemento. Tal como se emplea en esta especificación, "fragmento funcional" con respecto a anticuerpos, se refiere a fragmentos Fv, F(ab) y F(ab')₂. Un fragmento "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y unión a diana completo. Esta región consta de un dímero de un dominio variable de una cadena pesada y una cadena ligera en asociación no covalente estrecha (dímero V_H -V_L). Es en esta configuración que las tres CDRs de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a diana en la superficie del dímero V_H -V_L. Colectivamente, las seis CDRs confieren al anticuerpo especificidad de unión a diana. No obstante, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprenda únicamente tres CDRs específicas para una diana) tiene la capacidad de reconocer y unirse a la diana. Fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena única" o "sFv" comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para

la unión a la diana.

[00030] El fragmento Fab contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos cuantos residuos en el término carboxilo del dominio de cadena pesada CH1, incluidas una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Los fragmentos F(ab') se producen por escisión del puente disulfuro en las cisteínas de la bisagra del producto de digestión con pepsina F(ab')₂. Acoplamientos químicos adicionales de fragmentos de anticuerpo son conocidos por las personas de habilidad ordinaria en el arte.

[00031] El término "anticuerpo monoclonal", como se emplea en esta especificación, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un solo sitio diana. Más aún, en contraste con preparaciones de anticuerpos (policlonales) que, típicamente, incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en la diana. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en el sentido de que pueden sintetizarse mediante el cultivo de hibridomas, incontaminados por otras inmunoglobulinas. El calificativo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no tiene que interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por algún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para uso con la presente invención pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en bacteriófagos, usando técnicas bien conocidas. Los anticuerpos monoclonales parentales a usarse de acuerdo con la presente invención

25

pueden elaborarse por el método del hibridoma, descrito por primera vez por Kohler and Milstein, *Nature* 256, 495 (1975), o pueden elaborarse por métodos recombinantes.

[00032] Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o sus fragmentos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a diana de anticuerpos), que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de por lo menos uno y, típicamente dos, dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado puede contener además por lo menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una plantilla de inmunoglobulina humana elegida.

[00033] Métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en el arte. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo residuos de "importación", los cuales se toman típicamente de un dominio variable de "importación". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colegas [Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)], sustituyendo CDRs o secuencias CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de los Estados Unidos No. 4,816,567), en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha

26

sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los cuales algunos residuos CDR y, posiblemente, algunos residuos FR se sustituyen con residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

[00034] La elección de dominios variables humanos, ligeros y pesados, para usarlos en elaborar los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad y/o la respuesta HAMA (anticuerpo-antirátón humano) cuando el anticuerpo se destina a uso terapéutico humano. La reducción o eliminación de una respuesta HAMA es generalmente un aspecto significativo del desarrollo clínico de agentes terapéuticos apropiados. Véase, por ejemplo, Khaxzaeli et al., *J. Natl. Cancer Inst.* (1988), 80:937; Jaffers et al., *Transplantation* (1986), 41:572; Shawler et al., *J. Immunol.* (1985), 135:1530; Sears et al., *J. Biol. Response Mod.* (1984), 3:138; Miller et al., *Blood* (1983), 62:988; Hakimi et al., *J. Immunol.* (1991), 147:1352; Reichmann et al., *Nature* (1988), 332:323; Junghans et al., *Cancer Res.* (1990), 50:1495. Como se describe en esta especificación, la invención provee anticuerpos que se humanizan de modo que la respuesta HAMA se reduzca o elimine. Variantes de estos anticuerpos pueden obtenerse además usando métodos rutinarios conocidos en el arte, algunos de los cuales se describen a continuación con más detalle. De acuerdo con el denominado método de "ajuste óptimo", se criba la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor contra toda la biblioteca de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia de dominio V humana que es más próxima a la del roedor se acepta entonces como la región estructura (FR) humana para el anticuerpo humanizado Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987). Otro método usa una región estructura particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras y pesadas. El mismo marco puede utilizarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J.*

29

Immunol., 151:2623 (1993)).

[00035] Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo, como se describe en esta especificación, puede servir como secuencia de partida (parental) para la diversificación de la secuencia(s) de la estructura y/o secuencia(s) hipervariable(s). Una secuencia de estructura seleccionada, a la cual se conecta una secuencia hipervariable de partida, se designa en esta especificación como una estructura humana de aceptor. Aunque las estructuras humanas de aceptor pueden ser, o derivarse, de una inmunoglobulina humana (las regiones VL y/o VH de la misma), las estructuras humanas de aceptor pueden ser o derivarse de una secuencia de estructura de consenso humana, ya que se ha demostrado que tales estructuras poseen una inmunogenicidad mínima, o ninguna, en pacientes humanos. Una "estructura humana de aceptor" para los propósitos contemplados en esta especificación es una estructura que comprende la secuencia de aminoácidos de una estructura VL o VH derivada de una estructura de inmunoglobulina humana, o de una estructura de consenso humana. Una estructura humana de aceptor "derivada de" una estructura de inmunoglobulina humana o estructura de consenso humana pueden comprender su misma secuencia de aminoácidos, o pueden contener cambios de secuencia de aminoácidos pre-existentes. Donde los cambios de aminoácidos pre-existentes están presentes, preferiblemente no más de 5 y preferiblemente 4 o menos, o 3 o menos, cambios de amino-ácidos pre-existentes están presentes. En una incorporación, la estructura humana de aceptor VH es idéntica en secuencia a la secuencia de la estructura de inmunoglobulina humana VH o secuencia de estructura de consenso humana. En una incorporación, la estructura humana de aceptor VL es idéntica en secuencia a la secuencia de estructura de inmunoglobulina humana VL o la secuencia de estructura de consenso humana. Una "estructura de consenso humana" es una estructura que representa el residuo de aminoácidos de ocurrencia más común en una selección de secuencias de estructura VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la

28

selección de secuencia VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.* En una incorporación, para el VL, el subgrupo es un subgrupo kappa I como en Kabat *et al.* En una incorporación, para el VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat *et al.*

[00036] Donde el aceptor se deriva de una inmunoglobulina humana, se puede seleccionar opcionalmente una secuencia de estructura humana que se selecciona con base en su homología con la secuencia de estructura de donador alineando la secuencia de estructura de donador con varias secuencias de estructura humana en un conjunto de de secuencias de estructura humana, y seleccionar la secuencia de estructura más homóloga como el aceptor. La estructura humana del aceptor puede ser o derivarse de secuencias de línea germinal de anticuerpo humano disponibles en las bases de datos públicas.

[00037] En una incorporación, las estructuras de consenso humanas contempladas en esta especificación son, o se derivan, de secuencias de estructura de consenso del subgrupo VII VH y/o subgrupo I kappa VL.

[00038] En una incorporación, la plantilla de estructura humana utilizada para la generación de un anticuerpo anti-Factor D puede comprender secuencias de estructura de una plantilla que incluye una combinación de VI-4.1b+ (familia VH7) y JH4d para la cadena VH (Figura 3) y/o una combinación de DPK4 (familia VKI) y JK2 para la cadena VL (Figura 4).

[00039] Por consiguiente, la estructura humana del aceptor VH puede comprender uno, dos, tres o la totalidad de las siguiente secuencias de estructura: FR1 que comprende QX₁QLVQSGX₂ELKKPGASVKVSKAS (aminoácidos 1-25 de SEQ ID NO: 27), en donde X₁ es I o V, X₂ es P o S;

FR2 que comprende WVX₃QAPGQGLE (aminoácidos 36-46 de SEQ ID NO: 27), en donde X₃ es K o R; FR3 que comprende RFVFSLDTSVSTAYLQISSSLKAEDTAX₄YYCX₅R (aminoácidos 67-98 de SEQ ID NO: 27), en donde X₄ es T o V, X₅ es E o A; FR4 que comprende WGQGTLVTVSS (aminoácidos 105-115 de SEQ ID NO: 8 o aminoácidos 105-115 de SEQ ID NO: 27)

[00040] Ejemplos de estructuras de consenso VH incluyen:

estructura de consenso de subgrupo I VH humana menos CDRs de Kabat (SEQ ID NO:28);

estructura de consenso de subgrupo I VH menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs: 29-31);

estructura de consenso de subgrupo II VH humana menos CDRs de Kabat (SEQ ID NO: 32);

estructura de consenso de subgrupo II VH humana menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs: 33-35);

estructura de consenso de subgrupo III VH humana menos CDRs de Kabat (SEQ ID NO:36);

estructura de consenso de subgrupo III VH humana menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO: 37-39);

estructura de consenso de subgrupo VII VH humana menos CDRs de Kabat (SEQ ID NO:55);

estructura de consenso de subgrupo VII VH humana menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO: 56-58);

estructura de aceptor VH humana menos CDRs de Kabat (SEQ ID NO: 40);

estructura de aceptor VH humana menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs: 41-42);

estructura de aceptor 2 VH humana menos CDRs de Kabat (SEQ ID NO: 43); o

estructura de aceptor 2 VH humana menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs: 44-45).

30

[00041] En una incorporación, la estructura humana de aceptor VH comprende una, dos, tres o la totalidad de las siguientes secuencias de estructura:

FR1 que comprende QVQLVQSGPELKKPGASVKVSCAS (aminoácidos 1-25 de SEQ ID NO: 8),

FR2 que comprende WVRQAPGQGLE (aminoácidos 36-46 de SEQ ID NO: 8),

FR3 que comprende RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCER (aminoácidos 67-98 de SEQ ID NO: 8),

RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCE (aminoácidos 67-97 de SEQ ID NO: 8),

RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYC (aminoácidos 67-96 de SEQ ID NO: 8),

RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCS (SEQ ID NO: 51), o

RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCSR (SEQ ID NO: 52)

FR4 que comprende WGQGTLVTVSS (aminoácidos 105-115 de SEQ ID NO: 8 o aminoácidos 105-115 de SEQ ID NO: 27).

[00042] La estructura humana de aceptor VL comprende una, dos, tres o la totalidad de las siguientes secuencias de estructura:

FR1 que comprende DIQX₆TQSPSSLX₇SVGDRVITTC (aminoácidos 1-23 de SEQ ID NO: 26), en donde X₆ es V o M, X₇ es M o A;

FR2 que comprende WYQQKPGKX₈PKLLIX₉ (aminoácidos 35-49 de SEQ ID NO: 26), en donde X₈ es P o V, X₉ es S o Y;

FR3 que comprende GVPSRFSX₁₀SGSGX₁₁DFTLTISLQPEDVATYYC (aminoácidos 57-88 de SEQ ID NO: 26), en donde X₁₀ es S o G, X₁₁ es A o T;

FR4 que comprende FGQGTX₁₂EIK (SEQ ID NO: 54), en donde X₁₂ es V o L.

[00043] Ejemplos de estructuras de consenso VL incluyen:

estructura de consenso de subgrupo I kappa VL humana (SEQ ID NO: 47);

estructura de consenso de subgrupo II kappa VL humana (SEQ ID NO: 48);
estructura de consenso de subgrupo III kappa VL humana (SEQ ID NO: 49); o
estructura de consenso de subgrupo IV kappa VL humana (SEQ ID NO: 50)

[00044] En una incorporación, la estructura humana de aceptor VL puede comprender una, dos, tres o la totalidad de las siguientes secuencias de estructura:

FR1 que comprende DIQVTQSPSSLSASVGDRVITC (aminoácidos 1-23 de SEQ ID NO: 7),

FR2 que comprende WYQQKPGKVPKLLIS (aminoácidos 35-49 de SEQ ID NO: 7),

FR3 que comprende GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYC (aminoácidos 57-88 de SEQ ID NO: 7),

FR4 que comprende FGQGTKLEIK (aminoácidos 98-107 de SEQ ID NO: 7), o FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 53).

[00045] Aunque el aceptor puede ser idéntico en secuencia a la secuencia de estructura humana seleccionada, sea de una inmunoglobulina humana o estructura de consenso humana, la presente invención contempla que la secuencia de aceptor puede comprender sustituciones de aminoácidos pre-existentes, relativas a la secuencia de inmunoglobulina humana o secuencia de estructura de consenso humana. Las sustituciones pre-existentes son preferiblemente mínimas; usualmente cuatro, tres, dos o una diferencias de aminoácidos, únicamente relativas a la secuencia de inmunoglobulina humana o secuencia de estructura de consenso.

[00046] Residuos de región hipervariable del anticuerpo no humano se incorporan en las estructuras humanas de aceptor VL y/o VH. Por ejemplo, se pueden incorporar residuos correspondientes a los residuos CDR de Kabat, los residuos de bucles hipervariables de Chothia, los residuos Abm, y/o residuos de contacto. Opcionalmente, se incorporan los residuos de

32

regiones hipervariables extendidas, en la siguiente forma: 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3), 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102, o 95-102 (H3).

[00047] En un aspecto, la invención provee un anticuerpo que comprende por lo menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVRs seleccionadas de (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 25; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 20; (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 24; y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 19.

[00048] En un aspecto, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D que comprende por lo menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVRs seleccionadas de (a) una HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 25; (b) una HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; (c) una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 20; (d) una HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% identidad de secuencia con una secuencia de

33

aminoácidos de SEQ ID NO: 16; (e) una HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 24; y (f) una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 19. En algunas incorporaciones, una HVR con una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% identidad de secuencia contiene sustituciones, inserciones, o eliminaciones (deleciones) relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo que comprende esa secuencia de aminoácidos conserva la capacidad de unirse al Factor D. En algunas incorporaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado, o eliminado en la secuencia de referencia seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 24. En algunas incorporaciones, la invención provee un anticuerpo que comprende por lo menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVRs seleccionadas de (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 25; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 20; (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 24; y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 19.

[00049] En un aspecto, la invención provee un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada seleccionado de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12. En un aspecto, la invención provee un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera seleccionado de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 11. En un aspecto, la invención provee un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene SEQ ID NO: 6. En un aspecto, la invención provee un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que contiene SEQ ID NO: 5. En un aspecto, la invención provee un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene SEQ ID NO: 6 y un dominio variable de cadena ligera que contiene SEQ ID NO: 5. En un aspecto, la invención provee un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene SEQ ID NO: 8. En un aspecto, la invención provee un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que contiene SEQ ID NO: 7. En un aspecto, la invención provee un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene SEQ ID NO: 8 y un dominio variable de cadena ligera que contiene SEQ ID NO: 7. En un aspecto, la invención provee un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene SEQ ID NO: 10. En un aspecto, la invención provee un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que contiene SEQ ID NO: 9. En un aspecto, la invención provee un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene SEQ ID NO: 10 y un dominio variable de cadena ligera que contiene SEQ ID NO: 9. En un aspecto, la invención provee un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene SEQ ID NO: 12. En un aspecto, la invención provee un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que contiene SEQ ID NO: 11. En un aspecto, la invención provee un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene SEQ ID NO: 12 y un dominio variable de cadena ligera que contiene SEQ ID NO: 11.

[00050] En un aspecto, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NO: 6, 8, 10 y 12. En algunas incorporaciones, una secuencia de aminoácidos que posee por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% identidad de secuencia contiene sustituciones, inserciones, o eliminaciones (deleciones), relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo que comprende esa secuencia de aminoácidos conserva la capacidad de unirse al Factor D. En algunas incorporaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado o eliminado en una secuencia seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NO: 6, 8, 10 o 12. En algunas incorporaciones, las sustituciones, inserciones o eliminaciones (deleciones) ocurren en regiones fuera de las HVRs (es decir, en las FRs). En algunas incorporaciones, un anticuerpo anti-Factor D comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NO: 6, 8, 10 o 12.

[00051] En algunas incorporaciones, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D que comprende un dominio variable de cadena ligera que contiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NO: 5, 7, 9 y 11. En algunas incorporaciones, una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% identidad de secuencia contiene sustituciones, inserciones o eliminaciones (deleciones), relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo que comprende esa secuencia de aminoácidos conserva la capacidad de unirse al Factor D. En algunas

36

incorporaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado o eliminado en una secuencia seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NO: 5, 7, 9 y 11. En algunas incorporaciones, las sustituciones, inserciones o eliminaciones (deleciones) ocurren en regiones fuera de las HVRs (es decir, en las FRs). En algunas incorporaciones, un anticuerpo anti-Factor D comprende un dominio variable de cadena ligera que contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NO: 5, 7, 9 y 11.

[00052] Un anticuerpo anti-Factor D puede contener cualquier secuencia de dominio variable de estructura apropiada, siempre que el anticuerpo conserve la capacidad de unirse al Factor D. Por ejemplo, en algunas incorporaciones, anticuerpos anti-Factor D de la invención comprenden una secuencia de estructura de dominio variable de cadena pesada que es una combinación de VI.4.1 b+ y JH4d (véase Figura 3). En algunas incorporaciones, anticuerpos anti-Factor D de la invención comprenden una secuencia de consenso de estructura de cadena pesada de subgrupo VII humana. En algunas incorporaciones, anticuerpos anti-Factor D de la invención comprenden una secuencia de estructura de dominio variable de cadena pesada que incluye una FR1 que contiene los aminoácidos 1-25 de SEQ ID NO: 8, FR2 que contiene los aminoácidos 36-46 de SEQ ID NO: 8, FR3 que contiene los aminoácidos 67-98 de SEQ ID NO: 8 y FR4 que contiene los aminoácidos 105-115 de SEQ ID NO: 8. En una incorporación de estos anticuerpos, la secuencia de dominio variable de cadena pesada comprende la sustitución (sustituciones) en la posición 40 y/o 88 (numeración de Kabat). En una incorporación de estos anticuerpos, la posición 40 es cisteína (C) o alanina (A) y/o la posición 88 es cisteína (C) o alanina (A). En algunas incorporaciones, anticuerpos anti-Factor D de la invención comprenden una secuencia de estructura de dominio variable de cadena ligera que es una combinación de DPK4 y JK2 (véase Figura 4). En algunas incorporaciones, anticuerpos anti-Factor D de la invención comprenden una secuencia de consenso de estructura de cadena ligera

kappa I (κI). En algunas incorporaciones, anticuerpos anti-Factor D de la invención comprenden una secuencia de estructura de dominio variable de cadena ligera que incluye una FR1 que contiene los aminoácidos 1-23 de SEQ ID NO: 7, FR2 que contiene los aminoácidos 35-49 de SEQ ID NO: 7, FR3 que contiene los aminoácidos 57-88 de SEQ ID NO: 7 y FR4 que contiene los aminoácidos 98-107 de SEQ ID NO: 7. En una incorporación de estos anticuerpos, la secuencia de estructura variable de cadena ligera comprende una o más sustitución (sustituciones) en la posición 15, 43 y/o 104 (numeración de Kabat). En una incorporación de estos anticuerpos, la posición 15 es cisteína (C) o valina (V), la posición 43 es cisteína (C) o alanina (A) y/o la posición 104 es valina (V) o leucina (L).

[00053] Además, un anticuerpo anti-Factor D puede incluir cualquier secuencia de dominio constante apropiada, siempre que el anticuerpo conserve la capacidad de unirse al Factor D. Por ejemplo, en algunas incorporaciones, anticuerpos anti-Factor D de la invención contienen por lo menos una porción de un dominio constante de cadena pesada. En una incorporación, anticuerpos anti-Factor D de la invención contienen un dominio constante de cadena pesada de cualquiera o una combinación de una cadena pesada α , δ , ϵ , γ , o μ . Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), pueden asignarse inmunoglobulinas a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas α , δ , ϵ , γ , o μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen adicionalmente en subclases sobre la base de diferencias relativamente menores en la secuencia C_H y la función, por ejemplo, los humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2. En una incorporación, anticuerpos anti-Factor D de la invención contienen un dominio constante de cadena pesada que incluye sustituciones en posiciones de aminoácidos, las cuales resultan en un efecto deseado sobre la función efectora (por ejemplo, afinidad de unión). En una incorporación, anticuerpos anti-Factor D de la invención contienen un

dominio constante de cadena pesada que incluye sustituciones en posiciones de aminoácidos, las cuales no resultan en un efecto sobre la función efectora (por ejemplo, afinidad de unión). En una incorporación, anticuerpos anti-Factor D de la invención contienen un dominio constante de cadena pesada del tipo IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) y contienen además una sustitución en la posición 114 (numeración de Kabat; equivalente a 118 en la numeración EU), 168 (numeración de Kabat; equivalente a 172 en la numeración EU), 172 (numeración de Kabat; equivalente a 176 en la numeración EU) y/o 228 (numeración EU). En una incorporación, anticuerpos anti-Factor D de la invención contienen un dominio constante de cadena pesada del tipo IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) y contienen además una sustitución en la posición 114 en donde la posición 114 es una cisteína (C) o alanina (A), la posición 168 es cisteína (C) o alanina (A), la posición 172 es una cisteína (C) o alanina (A) y/o la posición 228 es una prolina (P), arginina (R) o serina (S).

[00054] Además, por ejemplo, en algunas incorporaciones, anticuerpos anti-Factor D de la invención contienen por lo menos una porción de un dominio constante de cadena ligera. En una incorporación, anticuerpos anti-Factor D de la invención contienen un dominio constante de cadena ligera de una cualquiera o una combinación de una cadena ligera kappa o lambda, ya que la cadena ligera de cualquier especie vertebrada puede asignarse a uno de dos tipos distintos, llamados kappa y lambda, basados en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. En una incorporación, anticuerpos anti-Factor D de la invención contienen un dominio constante de cadena ligera que incluye sustituciones en posiciones aminoácidos, que resultan en un efecto deseado sobre la función efectora (por ejemplo, afinidad de unión). En una incorporación, anticuerpos anti-Factor D de la invención contienen un dominio constante de cadena ligera que incluye sustituciones en posiciones de aminoácidos que no resultan en un efecto sobre la función efectora (por ejemplo, afinidad de unión). En una incorporación, anticuerpos anti-Factor D de la invención contienen un

dominio constante de cadena ligera del tipo kappa y contienen además una sustitución en la posición 110, 144, 146 y/o 168 (numeración de Kabat). En una incorporación, anticuerpos anti-Factor D de la invención contienen un dominio constante de cadena ligera del tipo kappa y contienen además una sustitución en la posición 110 en donde 110 es una cisteína (C) o valina (V), en la posición 144 en donde 144 es una cisteína (C) o alanina (A), en la posición 146 en donde 146 es una isoleucina (I) o valina (V) y/o en la posición 168 en donde 168 es una cisteína (C) o serina (S).

[00055] En un aspecto, la invención provee anticuerpos que compiten con el anticuerpo 166-32 murino y/o clon del anticuerpo anti-Factor D humanizado #56, #111, #250 o #416, y/o un anticuerpo que contiene el dominio variable o las secuencias HVR del clon del anticuerpo anti-Factor D humanizado #56, #111, #250 o #416. Se proveen así mismo anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo murino 166-32 y/o el clon del anticuerpo anti-Factor D humanizado #56, #111, #250 o #416, y/o un anticuerpo que comprende el dominio variable o secuencias HVR del clon del anticuerpo anti-Factor D humanizado #56, #111, #250 o #416.

[00056] En una incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad monovalente del anticuerpo al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) es menor, por ejemplo por lo menos 1 vez o 2 veces menor que la afinidad monovalente de un anticuerpo quimérico (por ejemplo, afinidad del anticuerpo quimérico como un fragmento Fab al Factor D), que contiene, conformado o esencialmente conformado por un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 2 y un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 1.

[00057] En una incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad bivalente del anticuerpo al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG al Factor D) es menor, por

ejemplo por lo menos 1 vez o 2 veces menor que la afinidad bivalente de un anticuerpo quimérico (por ejemplo, afinidad del anticuerpo quimérico como una IgG al Factor D), que contiene, conformado o esencialmente conformado por un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 2 y un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 1.

[00058] En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad monovalente del anticuerpo al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) es mayor, por ejemplo por lo menos 1 vez o 2 veces mayor que la afinidad monovalente de un anticuerpo quimérico (por ejemplo, afinidad del anticuerpo quimérico como un fragmento Fab al Factor D), que contiene, conformado o esencialmente conformado por un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 2 y un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 1.

[00059] En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde afinidad bivalente del anticuerpo al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG al Factor D) es mayor, por ejemplo por lo menos 1 vez o 2 veces mayor que la afinidad bivalente de un anticuerpo quimérico (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo quimérico como una IgG al Factor D), que contiene, conformado o esencialmente conformado por un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 2 y un dominio variable de cadena pesada SEQ ID NO: 1.

[00060] En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) es 1.0 nM (1.0×10^{-9} M) o mejor. En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) es 0.5 nM (0.5×10^{-9} M) o

mejor. En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) es 1.0 pM (1.0×10^{-12} M) o mejor. En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) es 0.5 pM (0.5×10^{-12} M) o mejor.

[00061] En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG al Factor D) es 1.0 nM (1.0×10^{-9} M) o mejor. En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG al Factor D) es 0.5 nM (0.5×10^{-9} M) o mejor. En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG al Factor D) es 1.0 pM (1.0×10^{-12} M) o mejor. En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG al Factor D) es 0.5 pM (0.5×10^{-12} M) o mejor.

[00062] En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) está entre 0.5 mM (0.5×10^{-6} M) y 0.5 pM (0.5×10^{-12} M). En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) está entre 15 nM (15×10^{-9} M) y 0.1 nM (0.1×10^{-9} M). En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en

su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) está entre 5.5 nM (5.5×10^{-9} M) y 1 nM (1×10^{-9} M). En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) está entre 0.5 pM (0.5×10^{-12} M) y 2 pM (2×10^{-12} M).

[00063] En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG al Factor D) está entre 0.5 mM (0.5×10^{-6} M) y 0.5 pM (0.5×10^{-12} M). En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG al Factor D) está entre 10 nM (10×10^{-9} M) y 0.05 nM (0.05×10^{-9} M). En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG al Factor D) está entre 5.5 nM (5.5×10^{-9} M) y 1 nM (1×10^{-9} M). En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG al Factor D) está entre 0.5 pM (0.5×10^{-12} M) y 2 pM (2×10^{-12} M).

[00064] En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) es alrededor de 3.7 nM (3.7×10^{-9} M). En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) es alrededor de 3.3 nM (3.3×10^{-9} M). En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma monovalente al

Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) es alrededor de 5.1 nM (5.1×10^{-9} M). En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) es alrededor de 2.7 nM (2.7×10^{-9} M). En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) es alrededor de 1.4 nM (1.4×10^{-9} M). En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) es alrededor de 1.4 pM (1.4×10^{-12} M). En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG al Factor D) es alrededor de 1.1 pM (1.1×10^{-12} M). En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) es alrededor de 0.19 nM (0.19×10^{-9} M). En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG al Factor D) es alrededor de 0.08 nM (0.08×10^{-9} M). En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) es alrededor de 12.3 nM (12.3×10^{-9} M). En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG al Factor D) es alrededor de 9.0 nM (9.0×10^{-9} M).

Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG al Factor D) está entre 5.5 nM (5.5×10^{-9} M) y 1 nM (1×10^{-9} M). En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG al Factor D) está entre 0.5 pM (0.5×10^{-12} M) y 2 pM (2×10^{-12} M).

[00064] En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) es alrededor de 0.37 nM (3.7×10^{-10} M). En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) es alrededor de 0.33 nM (3.3×10^{-10} M). En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) es alrededor de 0.51 nM (5.1×10^{-10} M). En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) es alrededor de 2.7 nM (2.7×10^{-9} M). En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) es alrededor de 1.4 nM (1.4×10^{-9} M). En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) es alrededor de 1.4 pM (1.4×10^{-12} M). En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG al Factor D) es alrededor de 1.1 pM (1.1×10^{-12} M). En otra incorporación, la invención

45

proporciona un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) es alrededor de 0.19 nM (0.19×10^{-9} M). En otra incorporación, la invención proporciona un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG al Factor D) es alrededor de 0.08 nM (0.08×10^{-9} M). En otra incorporación, la invención proporciona un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al

[00065] En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) es alrededor de 1.4 pM (1.4×10^{-12} M) $\pm$ 0.5. En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG al Factor D) es alrededor de 1.1 pM (1.1×10^{-12} M) $\pm$ 0.6. En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) es alrededor de 0.19 nM (0.19×10^{-9} M) $\pm$.01. En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG al Factor D) es alrededor de 0.08 nM (0.08×10^{-9} M) $\pm$ 0.01. En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) es alrededor de 12.3 nM (12.3×10^{-9} M) $\pm$ 2. En otra incorporación, la invención provee un anticuerpo anti-Factor D en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG al Factor D) es alrededor de 9.0 nM (9.0×10^{-9} M) $\pm$ 1.

[00066] En otra incorporación, un anticuerpo anti-Factor D puede tener una afinidad en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) de alrededor de 3.7 nM (3.7×10^{-9} M) $\pm$ 2. En otra incorporación, un anticuerpo anti-Factor D puede tener una afinidad en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) de alrededor de 3.3 nM (3.3×10^{-9} M) $\pm$ 2. En otra incorporación, un anticuerpo anti-Factor D puede tener una afinidad en su forma monovalente

al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) de alrededor de 5.1 nM (5.1×10^{-9} M) $\pm$ 2. En otra incorporación, un anticuerpo anti-Factor D puede tener una afinidad en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) de alrededor de 2.7 nM (2.7×10^{-9} M) $\pm$ 2. En otra incorporación, un anticuerpo anti-Factor D puede tener una afinidad en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) de alrededor de 1.4 nM (1.4×10^{-9} M) $\pm$ 2. En otra incorporación, un anticuerpo anti-Factor D puede tener una afinidad en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) de alrededor de 1.4 pM (1.4×10^{-12} M) $\pm$ 2. En otra incorporación, un anticuerpo anti-Factor D puede tener una afinidad en su forma bivalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG al Factor D) de alrededor de 1.1 pM (1.1×10^{-12} M) $\pm$ 2. En otra incorporación, un anticuerpo anti-Factor D puede tener una afinidad en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) es alrededor de 0.19 nM (0.19×10^{-9} M) $\pm$ 2. En otra incorporación, un anticuerpo anti-Factor D puede tener una afinidad en su forma bivalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG al Factor D) es alrededor de 0.08 nM (0.08×10^{-9} M) $\pm$ 2. En otra incorporación, un anticuerpo anti-Factor D puede tener una afinidad en su forma monovalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab al Factor D) es alrededor de 12.3 nM (12.3×10^{-9} M) $\pm$ 2. En otra incorporación, un anticuerpo anti-Factor D puede tener una afinidad en su forma bivalente al Factor D (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG al Factor D) es alrededor de 9.0 nM (9.0×10^{-9} M) $\pm$ 2.

[00067] Como está bien establecido en el arte, la afinidad de unión de un ligando a su receptor puede determinarse usando cualquiera de una variedad de análisis, y expresarse en términos de una variedad de valores cuantitativos. En consecuencia, en una incorporación, la afinidad de unión

se expresa como valores K_d y refleja una afinidad de unión intrínseca (por ejemplo, como efectos de avidéz minimizados). General y preferiblemente, la afinidad de unión se mide *in vitro*, ya sea en un escenario libre de células o asociado con células. Como se describe con mayor detalle en esta especificación, los múltiplos de diferencia ("*the fold difference*") en la afinidad de unión pueden cuantificarse en términos de la relación del valor de afinidad de unión monovalente de un anticuerpo humanizado (por ejemplo, en forma Fab) y el valor de afinidad de unión monovalente de un anticuerpo de referencia/comparador (por ejemplo, en forma Fab) (por ejemplo, un anticuerpo murino que tiene secuencias de región hipervariable de donador), en donde los valores de afinidad de unión se determinan bajo condiciones similares de análisis. Por consiguiente, en una incorporación, los múltiplos de diferencia en afinidad de unión se determina como la relación de los valores K_d del anticuerpo humanizado en forma Fab y el citado anticuerpo de referencia/comparador. Por ejemplo, en una incorporación, si un anticuerpo de la invención (A) tiene una afinidad que es "3 veces menor" que la afinidad de un anticuerpo de referencia (M), entonces si el valor K_d para A es 3x, el valor K_d de M sería 1x, y la relación del K_d de A al K_d de M sería 3:1. Inversamente, en una incorporación, si un anticuerpo de la invención (C) tiene una afinidad que es "3 veces mayor" que la afinidad de un anticuerpo de referencia (R), entonces el valor K_d para C es 1x, el valor K_d de R sería 3x, y la relación del K_d de C al K_d de R sería 1:3. Cualquiera de un número de análisis conocidos en el arte, incluidos los descritos en esta solicitud, puede usarse para obtener medidas de afinidad de unión, incluyendo, por ejemplo, Biacore, radioinmunoanálisis (RIA) y ELISA.

[00068] Además, los valores K_d para un anticuerpo de la invención pueden variar dependiendo de las condiciones del análisis particular utilizado. Por ejemplo, en una incorporación, las mediciones de afinidad de unión pueden obtenerse en un análisis en donde el Fab o anticuerpo se inmoviliza y se mide la unión del ligando, es decir Factor D, o

alternativamente, el ligando, es decir Factor D, para el Fab o anticuerpo se inmoviliza y se mide la unión del Fab o anticuerpo. En una incorporación, las mediciones de afinidad de unión pueden obtenerse en un análisis en donde las condiciones de regeneración pueden comprender (1) 10mM glicina o 4M $MgCl_2$ a pH 1.5, y (2) pH entre un pH de 1.0 y un pH de 7.5, incluidos un pH de 1.5, un pH de 5.0, un pH de 6.0 y un pH de 7.2. En una incorporación, las mediciones de afinidad de unión pueden obtenerse en un análisis en donde las condiciones de unión pueden comprender (1) PBS o solución salina amortiguada con HEPES y (2) Tween-20, es decir, 0.1% Tween-20. En una incorporación, las mediciones de afinidad de unión pueden obtenerse en un análisis en donde la fuente del ligando, es decir, Factor D, puede ser de fuentes disponibles en el comercio. En una incorporación, las mediciones de afinidad de unión pueden obtenerse en un análisis en donde (1) el Fab o anticuerpo se inmoviliza y se mide la unión del ligando, es decir, Factor D, (2) las condiciones de regeneración comprenden 4M $MgCl_2$ a pH 7.2 y (3) las condiciones de unión comprenden solución salina amortiguada con HEPES, pH 7.2, que contiene 0.1% Tween-20. En una incorporación, las mediciones de afinidad de unión pueden obtenerse en un análisis en donde (1) el ligando, es decir, Factor D, se inmoviliza y se mide la unión del Fab o anticuerpo, (2) las condiciones de regeneración comprenden 10mM glicina a pH 1.5 y (3) las condiciones de unión comprende una solución amortiguadora PBS.

[00069] Los términos "célula", "línea celular" y "cultivo de células" incluyen progenie. Se entiende así mismo que toda progenie puede no ser precisamente idéntica en contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluyen progenies variantes que tienen la misma función o propiedad biológica, detectadas en la célula originalmente transformada. Las "células hospederas" empleadas en la presente invención generalmente son hospederos procariotas o eucariotas.

[00070] El término "vector" significa un constructo de ADN que

contiene una secuencia de ADN la cual se enlaza operacionalmente a una secuencia de control adecuada, capaz de efectuar la expresión del ADN en un hospedero apropiado. Tales secuencias de control incluyen un promotor para realizar la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar tal transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión de ribosomas de ARNm apropiados, y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. El vector puede ser un plásmido, una partícula de bacteriófago, o simplemente un inserto genómico potencial. Una vez transformado en un hospedero apropiado, el vector puede replicarse y funcionar independientemente del genoma del hospedero, o pueden, en algunos casos, integrarse en el genoma mismo. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" se utilizan a veces indistintamente, ya que el plásmido es la forma más comúnmente usada de vector. No obstante, la invención tiene como finalidad incluir otras formas de vectores que sirven una función equivalente, como se conoce en el arte, o que pueden llegar a conocerse en él.

[00071] La palabra "etiqueta", cuando se emplea en esta especificación, se refiere a un compuesto o composición detectable, que puede conjugarse directa o indirectamente a una molécula o proteína, por ejemplo, un anticuerpo. La etiqueta puede ser detectable en sí misma (por ejemplo, etiquetas radioisótopo o etiquetas fluorescentes) o, en el caso de una etiqueta enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato, que es detectable.

[00072] Tal como se emplea en esta especificación, "fase sólida" significa una matriz no acuosa a la cual puede adherirse el anticuerpo de la presente invención. Ejemplos de fases sólidas comprendidas en esta especificación incluyen las formadas parcial o enteramente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, polistireno, alcohol polivinílico y siliconas. En ciertas incorporaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede

comprender el pocillo de una placa de análisis; en otras, es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad).

GENERACIÓN DE ANTICUERPOS

SELECCIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS HOSPEDERAS

[00073] Células hospederas apropiadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en esta solicitud son las células procariotas, de levadura, o eucariotas superiores. Procariotas apropiados para este propósito incluyen organismos gram-negativos o gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia* y *Shigella*, así como *Bacilli*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*. Un hospedero de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31, 446), aunque son apropiadas otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27, 325). Estos ejemplos son ilustrativos y no limitantes.

[00074] Aparte de los procariotas, microbios eucarióticos tales como hongos filamentosos o levadura son hospederos de clonación o expresión apropiados para vectores que codifican el anticuerpo. *Saccharomyces cerevisiae* es el más comúnmente usado entre los microorganismos hospederos eucarióticos inferiores. Sin embargo, un número de otros géneros, especies y cepas se encuentran comúnmente disponibles y son útiles en esta solicitud, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces*; *Candida*; *Trichoderma*; *Neurospora crassa*; y hongos filamentosos tales como, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y hospederos *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

[00075] Células hospederas apropiadas para la expresión de anticuerpos glucosilados se derivan de organismos multicelulares. En particular, puede utilizarse cualquier cultivo de células eucariotas superiores, ya sea de cultivo de vertebrados o invertebrados. Ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto, Luckow et

al., Bio/Technology 6, 47-55 (1988); Miller et al., Genetic Engineering, Setlow et al. eds. Vol. 8, pp. 277-279 (Plenum publishing 1986); Mseda et al., Nature 315, 592-594 (1985). Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus y células hospederas de insecto permitidas correspondientes de hospederos tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Una variedad de cepas víricas para transfección se encuentran públicamente disponibles, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y tales virus pueden utilizarse como los virus contemplados en esta especificación, solicitud de acuerdo con la presente invención, particularmente para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. Más aún, como hospederos pueden utilizarse igualmente cultivos de células vegetales de algodón, maíz, papa, frijol de soya, petunia, tomate y tabaco.

[00076] Las células de vertebrado, y la propagación de células de vertebrado, en cultivo (cultivo de tejido) se ha vuelto un procedimiento de rutina. Véase Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Patterson, eds. (1973). Ejemplos de líneas celulares de hospederos mamíferos útiles son células de riñón de mono; células de riñón embrionario humano; células de riñón de crías de hámster; células de ovario de hámster chino/- DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células Sertoli de ratón; células de carcinoma cervical humano (HELA); células de riñón canino; células de pulmón humanas; células hepáticas humanas; tumor mamario de ratón; y células NSO.

[00077] Células hospederas se transforman con los vectores ya descritos para producción de anticuerpos y se cultivan en medio nutriente convencional, modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

53

[00078] Las células hospederas usadas para producir el anticuerpo de esta invención pueden cultivarse en una variedad de medios. Medios disponibles en el comercio tales como Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma) son apropiados para cultivar las células hospederas. Adicionalmente, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), Patentes de los Estados Unidos No. 4,767,704; 4,657,866; 4,560,655; 5,122,469; 5,712,163; o 6,048,728 puede utilizarse como medio de cultivo para las células hospederas. Cualquiera de estos medios pueden suplementarse, según sea necesario, con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruros X, donde X es sodio, calcio, magnesio; y fosfatos), soluciones amortiguadoras (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el medicamento GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos usualmente presentes en concentraciones finales en el rango micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualesquiera otros suplementos necesarios pueden incluirse asimismo en concentraciones apropiadas serían conocidos a los expertos en el arte. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son las empleadas previamente con la célula hospedera seleccionada para expresión, y serán evidentes para el profesional de habilidad ordinaria.

PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS

[00079] Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente en el medio. Si la variante del anticuerpo se produce intracelularmente, como un primer paso, los desechos de particulado, ya sea células hospederas o fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., Bio/Technology 10:163-167

(1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se segregan al espacio periplásmico de *E. coli*. En pocas palabras, pasta celular se descongela en la presencia de acetato de sodio (pH 3.5), EDTA, y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) durante alrededor de 30 minutos. Los desechos celulares pueden eliminarse por centrifugación. Donde la variante del anticuerpo se secreta en el medio, generalmente los sobrenadantes de tales sistemas de expresión se concentran primero usando un filtro de concentración de proteína disponible en el comercio, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Un inhibidor de proteasa tal como PMSF puede incluirse en cualquiera de los pasos anteriores para inhibir proteólisis, y antibióticos pueden incluirse para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

[00080] La composición de anticuerpo, preparada de las células, puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que está presente en la variante del anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas humanas IgG1, IgG2 o IgG4 (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para IgG3 humana (Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la cual se une el ligando de afinidad es muy a menudo agarosa, pero se encuentran disponibles otras matrices. Matrices mecánicamente estables, tales como cristal de poro controlado o poli(estirendivinil)benceno, permiten velocidades de flujo más rápidas y tiempos más cortos de procesamiento de los que pueden lograrse con agarosa. Donde la variante del anticuerpo comprende un dominio C_H3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para purificación. Dependiendo de la variante del anticuerpo a recuperarse, se encuentran disponibles también otras técnicas para purificación de proteínas

✓

tales como fraccionamiento en columna de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC de fase reversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina, cromatografía en SEPHAROSE™ o una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatofoco ("chromatofocusing"), SDS-PAGE, y precipitación en sulfato de amonio.

[00081] Luego de cualquier paso(s) preliminares de purificación, la mezcla que comprende la variante del anticuerpo de interés y los contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba con pH bajo usando una solución amortiguadora de elución con un pH entre alrededor de 2.5-4.5, efectuada preferiblemente con bajas concentraciones de sal (por ejemplo, desde alrededor de 0-0.25M de sal).

FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

[00082] Formulaciones terapéuticas del polipéptido o anticuerpo pueden prepararse para almacenamiento como formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas mezclando el polipéptido, que tiene el grado deseado de pureza, con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales "farmacéuticamente aceptables", empleados típicamente en el arte (todos los cuales se designan como "excipientes"). Por ejemplo, agentes amortiguadores, agentes estabilizantes, preservantes, isotonicantes, detergentes no iónicos, antioxidantes y otros aditivos misceláneos. (Véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, A. Osol, Ed. (1980)). Tales aditivos tienen que ser atóxicos a los destinatarios en las posologías y concentraciones empleadas.

[00083] Los agentes amortiguadores ayudan a mantener el pH en el rango que se aproxima a las condiciones fisiológicas. Están preferiblemente presentes en una concentración que varía desde alrededor de 2 mM a alrededor de 50 mM. Agentes amortiguadores apropiados para uso con la

presente invención incluyen ácidos tanto orgánicos como inorgánicos y sales de los mismos, tales como amortiguadores de citrato (por ejemplo, una mezcla de citrato monosódico-citrato disódico, una mezcla de ácido cítrico-citrato trisódico, una mezcla de de ácido cítrico-citrato monosódico, etc.), amortiguadores de succinato (por ejemplo, una mezcla de ácido succínico-succinato monosódico, una mezcla de de ácido succínico-hidróxido de sodio, una mezcla de ácido succínico-succinato disódico, etc.), amortiguadores de tartrato (por ejemplo, una mezcla de ácido tartárico-tartrato sódico, una mezcla de ácido tartárico-tartrato potásico, una mezcla de ácido tartárico-hidróxido de sodio, etc.), amortiguadores de fumarato (por ejemplo, una mezcla de ácido fumárico-fumarato monosódico, etc.), una mezcla de ácido fumárico-fumarato disódico, una mezcla de fumarato monosódico-fumarato disódico, etc.), amortiguadores de gluconato (por ejemplo, una mezcla de ácido glucónico-gluconato sódico, una mezcla de ácido glucónico-hidróxido de sodio, una mezcla de ácido glucónico-gluconato potásico, etc.), amortiguadores de oxalato (por ejemplo, una mezcla de ácido oxálico-oxalato sódico, una mezcla de ácido oxálico-hidróxido de sodio, una mezcla de ácido oxálico-oxalato potásico, etc.), amortiguadores de lactato (por ejemplo, una mezcla de ácido láctico-lactato sódico, una mezcla de ácido láctico-hidróxido de sodio, una mezcla de ácido láctico-lactato potásico, etc.) y amortiguadores de acetato (por ejemplo, una mezcla de ácido acético-acetato sódico, una mezcla de ácido acético-hidróxido de sodio, etc.). Adicionalmente, pueden mencionarse amortiguadores de fosfato, amortiguadores de histidina y sales de trimetilamina tales como Tris.

[00084] Preservantes pueden agregarse para retardar el crecimiento microbiano, y en cantidades que varían desde 0.2%-1% (p/v). Preservantes apropiados para uso con la presente invención incluyen fenol, alcohol bencílico, meta-cresol, metil parabeno, propil parabeno, cloruro de octadecildimetilbencil amonio, haluros de benzalconio (por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro), cloruro de hexametonio, alquil parabenos tales como metil o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, y 3-

pentanol.

[00085] Isotonicificantes, conocidos a veces como "estabilizantes" pueden agregarse para garantizar la isotonicidad de las composiciones líquidas de la presente invención e incluyen alcoholes de azúcar polihídricos, preferiblemente alcoholes de azúcar trihídricos o superiores, tales como glicerina, ertritol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol.

[00086] Los estabilizantes se refieren a una amplia categoría de excipientes que pueden variar en función desde un agente para impartir volumen hasta un aditivo, que solubiliza el agente terapéutico o ayuda a impedir la desnaturalización o adherencia a la pared del recipiente. Estabilizantes típicos pueden ser alcoholes de azúcar polihídricos (enumerados más arriba); aminoácidos tales como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc., azúcares orgánicos o alcoholes de azúcar, tales como lactosa, trehalosa, estaquiosa, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinisol, galactitol, glicerol y similares, incluidos ciclitos tales como inositol; polietilen glicol; polímeros de aminoácidos; agentes reductores con contenido de azufre, tales como urea, glutatona, ácido tióctico, tioglicolato sódico, tioglicerol, .alpha.-monotioglicerol y tiosulfato sódico; polipéptidos de bajo peso molecular (es decir, <10 residuos); proteínas tales como albúmina sérica humana, albúmina sérica bovina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como monosacáridos de polivinilpirrolidona, tales como xilosa, mannososa, fructosa, glucosa; disacáridos tales como lactosa, maltosa, sacarosa y trisacáridos tales como rafinosa; polisacáridos tales como dextran. Stabilizers may be present in the range from 0.1 to 10,000 weights per part of weight active protein.

[00087] Tensioactivos no iónicos o detergentes (también conocidos como "agentes humectantes") pueden agregarse para ayudar a solubilizar el agente terapéutico, así como para proteger la proteína terapéutica contra

agregación inducida por agitación, lo cual permite así mismo que la formulación se exponga a esfuerzo de superficie de cizalladura sin causar desnaturalización de la proteína. Tensioactivos no iónicos apropiados incluyen polisorbatos (20, 80, etc.), polioxámeros (184, 188 etc.), Pluronic.RTM.polioles, monoéteres de polioxietilen sorbitán (Tween.RTM.-20, Tween.RTM.-80, etc.). Tensioactivos no iónicos pueden estar presentes en un rango de alrededor de 0.05 mg/ml a alrededor de 1.0 mg/ml, preferiblemente alrededor de 0.07 mg/ml a alrededor de 0.2 mg/ml.

[00088] Excipientes misceláneos adicionales incluyen agentes para impartir volumen, (por ejemplo, almidón), agentes quelantes (, por ejemplo, EDTA), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metionina, vitamina E), y co-disolventes. La formulación contemplada en esta especificación puede contener igualmente más de un compuesto activo, según sea necesario, para la indicación particular que se está tratando, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proveer además un agente inmunosupresor. Tales moléculas están convenientemente presentes en combinación en cantidades que son efectivas para los propósitos previstos. Los ingredientes activos pueden atraparse también en microcápsulas, preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de co-acervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, MICROCÁPSULA DE hidroximetilcelulosa o gelatin y microcápsula de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas coloidales de aplicación de medicamentos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, A. Osal.Ed. (1980).

[00089] Las formulaciones a usarse para administración *in vivo* tienen que ser estériles. Esto se obtiene fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles. Pueden elaborarse preparaciones de

liberación sostenida. Ejemplos apropiados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semi-permeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la variante del anticuerpo, matrices que están en la forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (US 3773919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, etilen-vinil acetato no degradable, copolímeros degradables ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como etilen-vinil acetato y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un tiempo prolongado, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a humedad a 37°C, lo cual se traduce en una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en inmunogenicidad. Estrategias racionales pueden diseñarse para la estabilización, dependiendo del mecanismo involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de puentes S-S intermoleculares mediante intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede lograrse modificando residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones específicas de matriz polimérica.

[00090] La cantidad de polipéptido terapéutico, anticuerpo o fragmento del mismo, que será efectiva en el tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y puede determinarse por técnicas clínicas estándar. Donde sea posible, es deseable determinar la curva de respuesta a la dosis y las composiciones farmacéuticas de la invención primeramente *in vitro* y, luego, en sistemas

de modelos animales útiles, antes de probarlas en humanos.

[00091] En una incorporación preferida, una solución acuosa del polipéptido terapéutico, anticuerpo o fragmento del mismo se administra mediante inyección subcutánea. Cada dosis puede variar desde alrededor de 0.5 μg a alrededor de 50 μg por kilogramo de peso corporal o, más preferiblemente, desde alrededor de 3 μg a alrededor de 30 μg por kilogramo de peso corporal.

[00092] La pauta posológica para administración subcutánea puede variar desde una vez al mes a diariamente, dependiendo de un número de factores clínicos, incluidos el tipo de enfermedad, la gravedad de la enfermedad y la sensibilidad del sujeto al agente terapéutico.

USOS PARA EL ANTICUERPO HUMANIZADO

[00093] Los anticuerpos humanizados de la presente invención son útiles en análisis de diagnóstico, por ejemplo, para detectar la expresión de una diana de interés en células específicas, tejidos o suero. Para aplicaciones de diagnóstico, la variante del anticuerpo se etiquetará típicamente con una fracción detectable. Se dispone de numerosas etiquetas. Técnicas para cuantificar un cambio en fluorescencia se describen más arriba. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente mediante una reacción química y puede emitir entonces luz, la cual puede medirse (usando un quimioluminómetro, por ejemplo) o dona energía a un aceptor fluorescente. Ejemplos de etiquetas enzimáticas incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; Patente de los Estados Unidos No. 4,737,456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, malato dehidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano (HRPO – *horseradish peroxidase*), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasas, galactosa oxidasas y glucosa-6-fosfato dehidrogenasa), oxidasas

heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa, y similares. Técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos se describen en O'Sullivan et al., *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay*, in *Methods in Enzym.* (Ed. J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73: 147-166 (1981).

[00094] A veces, la etiqueta se conjuga indirectamente con la variante del anticuerpo. El profesional experto tendrá conocimiento de varias técnicas para lograrlo. Por ejemplo, la variante del anticuerpo puede conjugarse con biotina, y cualquiera de las tres categorías amplias de etiquetas mencionadas más arriba puede conjugarse con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a avidina y, por consiguiente, la etiqueta puede conjugarse con la variante del anticuerpo en esta manera indirecta. Alternativamente, para lograr la conjugación indirecta de la etiqueta con la variante del anticuerpo, la variante del anticuerpo se conjuga con un pequeño hapteno (por ejemplo, digloxina) y uno de los diferentes tipos de etiquetas mencionadas más arriba se conjuga con una variante del anticuerpo anti-hapteno (por ejemplo, anticuerpo anti-digloxina). En consecuencia, puede obtenerse la conjugación indirecta de la etiqueta con la variante del anticuerpo.

[00095] En otra incorporación de la invención, la variante del anticuerpo no necesita etiquetarse, y su presencia puede detectarse usando un anticuerpo etiquetado que se une a la variante del anticuerpo.

[00096] Los anticuerpos de la presente invención pueden emplearse en cualquier método de análisis conocido, tal como análisis de unión competitiva, análisis sandwich directos e indirectos, y análisis de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

[00097] Los análisis de unión competitiva se basan en la capacidad de un estándar etiquetado de competir con la muestra de prueba por la unión con una cantidad limitada de la variante del anticuerpo. La cantidad de diana en la muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de estándar que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad que se une, los anticuerpos generalmente se insolubilizan antes o después de la competición. Como resultado el estándar y la muestra de prueba que se unen a los anticuerpos pueden separarse convenientemente del estándar y la muestra de prueba que quedaron sin unirse.

[00098] Análisis sandwich implican el uso de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una porción inmunógena diferente, o epítipo, o la proteína a detectarse. En un análisis sandwich, la muestra de prueba se une por un primer anticuerpo que se inmoviliza en un soporte sólido y, posteriormente, un segundo anticuerpo se une a la muestra de prueba, formando así un complejo insoluble de tres partes. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,376,110. El segundo anticuerpo puede etiquetarse él mismo con una fracción detectable (análisis sandwich directos) o puede medirse usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que se etiqueta con una fracción detectable (análisis sandwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de análisis sandwich es un análisis ELISA, en el cual la fracción detectable es una enzima.

[00099] Para inmunohistoquímica, la muestra del tumor puede ser fresca o congelada, o puede incrustarse en parafina y fijarse con un preservante tal como, por ejemplo.

[000100] Los anticuerpos pueden usarse también en análisis diagnósticos *in vivo*. Generalmente, la variante del anticuerpo se etiqueta con un radionúclido (tal como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S), de modo que el tumor pueda localizarse usando inmunoescintigrafía. Por ejemplo, un anticuerpo anti-IgE de alta afinidad la presente invención puede

63

utilizarse para detectar la cantidad de IgE presente en, por ejemplo, los pulmones de un paciente asmático.

[000101] El anticuerpo de la presente invención puede suministrarse en un kit, es decir, una combinación empacada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para llevar a cabo el análisis diagnóstico. Donde el anticuerpo está etiquetado con una enzima, el kit puede incluir sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor sustrato que proporcione el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, pueden incluirse otros aditivos tales como estabilizantes, amortiguadores (por ejemplo, un amortiguador de bloqueo o amortiguador de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diferentes reactivos pueden variarse ampliamente para permitir concentraciones en solución de los reactivos, que sustancialmente optimicen la sensibilidad del análisis. Particularmente, los reactivos pueden proporcionarse en la forma de polvos secos, usualmente liofilizados, incluidos excipientes que, al disolverse, suministrarán una solución de reactivos con la concentración apropiada.

USOS IN VIVO PARA EL ANTICUERPO

[000102] Se contempla que los anticuerpos de la presente invención puedan usarse para tratar un mamífero. En una incorporación, el anticuerpo se administra a un mamífero no humano para los propósitos de obtener datos preclínicos, por ejemplo. Mamíferos ejemplares no humanos a tratarse incluyen primates no humanos, perros, gatos, roedores y demás mamíferos en los cuales se realizan estudios preclínicos. Tales mamíferos pueden establecerse en modelos animales para una enfermedad a tratar con el anticuerpo o pueden usarse para estudiar la toxicidad del anticuerpo de interés. En cada una de estas incorporaciones, estudios de dosis escalonada pueden llevarse a cabo en el mamífero.

[000103] El anticuerpo o polipéptido se administra por cualquier medio

apropiado, incluida la administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para tratamiento inmunosupresor local, administración intralesional. Infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. Además, la variante del anticuerpo se administra convenientemente mediante infusión de pulsación, particularmente con dosis decrecientes de la variante del anticuerpo. Preferiblemente, la posología se administra mediante inyecciones, muy preferiblemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

[000104] Para la prevención o tratamiento de enfermedad, la posología apropiada de anticuerpo o polipéptido dependerá del tipo de enfermedad a tratarse, la gravedad y ciclo de la enfermedad, si la variante del anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, la historia clínica del paciente y respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico a cargo del paciente.

[000105] Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, alrededor de 0.1 µg/kg a 150 mg/kg (por ejemplo, 0.1-20 mg/kg) de anticuerpo es una posología candidata inicial para administración al paciente, ya sea, por ejemplo, por una o más administraciones separadas, o por infusión continua. Una posología diaria típica podría variar desde alrededor de 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores ya mencionados. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se sostiene hasta cuando ocurra una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. El avance de esta terapia se monitorea fácilmente por técnicas y análisis convencionales. Un régimen posológico ejemplar se divulga en WO 94/04188.

[000106] Las composiciones de anticuerpo pueden formularse, dosificarse y administrarse en una manera consistente con la buena práctica

médica. Factores a tenerse en cuenta en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de aplicación del agente, el método de administración, la pauta de administración, y demás factores conocidos por los médicos. La "cantidad terapéuticamente efectiva" del anticuerpo a administrarse se regirá por tales consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar o tratar una enfermedad o trastorno. El anticuerpo no necesita formularse, pero se formula opcionalmente con uno o más agentes corrientemente utilizados para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad efectiva de tales otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y demás factores discutidos más arriba. Aquellos se usan generalmente en las mismas dosificaciones y por vías de administración como las usadas hasta la fecha o alrededor de desde 1 a 99% de las dosificaciones empleadas hasta ahora.

[000107] Los anticuerpos de la presente invención, que reconocen el Factor D como su diana, pueden usarse para tratar trastornos mediados por complemento. Estos trastornos están asociados con activación excesiva o incontrolada de complemento. Ellos incluyen: activación de complemento durante operaciones de bypass cardiopulmonar; activación de complemento debida a isquemia-reperfusión luego de infarto agudo del miocardio, aneurisma, apoplejía, choque hemorrágico, lesión por aplastamiento, insuficiencia multiorgánica, choque hipovolémico, isquemia intestinal u otros episodios causantes de isquemia. Se ha demostrado así mismo que la activación de complemento está asociada con enfermedades inflamatorias tales como quemaduras graves, endotoxemia, choque septicémico, síndrome disneico del adulto, hemodiálisis; choque anafiláctico, asma grave, angioedema, enfermedad de Crohn, anemia drepanocítica, glomerulonefritis pos-estreptocócica y pancreatitis. El trastorno puede ser el resultado de una reacción adversa a medicamentos, alergia por medicamentos, síndrome de

fuga vascular inducida por IL-2 o alergia a medio de contraste radiográfico. Incluye además enfermedad autoinmunitaria tal como lupus eritematoso sistémico, miastenia grave, artritis reumatoide, enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple. La activación de complemento se asocia igualmente con el rechazo de transplantes. La activación de complemento se asocia también con rechazo de transplantes. Recientemente se ha demostrado con una fuerte correlación entre la activación del complemento y las enfermedades oculares tales como degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética.

EJEMPLOS

[000108] Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplo 1: Humanización de MAb 166-32 Murino Factor D

[000109] Las secuencias de la región variable (V_H) de cadena pesada y la región variable (V_L) de cadena ligera del mAb 166-32 murino se compararon con secuencias de línea germinal del anticuerpo humano, disponibles en las bases de datos públicas. Se utilizaron varios criterios al decidir una plantilla, como se describe en el paso 1 más arriba, incluidos la longitud total, posición CDR similar dentro de la estructura, homología general, tamaño de la CDR, etc. La totalidad de estos criterios tomado conjuntamente aportaron un resultado para elegir la plantilla humana óptima, como se muestra en la alineación de secuencias entre las secuencias de cadenas ligeras y cadenas pesadas de MAb 166-32 MAb y las secuencias de la plantilla humana respectiva ilustradas en Figuras 3 y 4.

[000110] En este caso, se empleó más de una plantilla de estructura humana para diseñar este anticuerpo. La plantilla humana elegida para la cadena V_H era una combinación de VI-4.1 b+ (locus 7-04.1) (acceso #

X62110) (familia VH7) y JH4d (véase Figura 3). La plantilla humana elegida para la cadena V_L era una combinación de DPK4 (familia VK I) combinado con JK2 (véase Figura 4).

[000111] Una vez elegida la plantilla, se construyó una biblioteca Fab mediante síntesis de ADN y PCR traslapante. La biblioteca se componía de CDRs de MAb 166-32 sintetizadas con las respectivas plantillas humanas seleccionadas. Los nucleótidos traslapantes que codifican secuencias V_H y V_L parciales se sintetizaron en el rango de alrededor de 63 a alrededor de 76 nucleótidos con 18 a 21 traslapos de nucleótidos. Se construyeron vectores que expresan una biblioteca de Fabs humanizados contra el antígeno de Factor D, y se transformaron en *E. coli* DH10B luego se esparcieron sobre césped bacteriano XL-1B.

[000112] Se evaluó la calidad de la biblioteca en cuanto a tamaño (el número de clones independientes) y la diversidad (la distribución de las mutaciones). Los clones individuales con inserción doble de ambas cadenas ligeras y pesadas se secuenciaron alrededor de 14 de 20. Las mutaciones de titubeo ("*wobble mutations*") de la estructura se distribuyeron uniformemente.

[000113] La amplificación PCR del gen V_L y V_H se realizó utilizando un cebador directo ("*forward primer*") biotinilado que contenía la secuencia específica a la región de la estructura FR1 y una secuencia protuberante ("*overhanging sequence*") apareada al extremo de la secuencia líder (GeneIII) y un cebador inverso de la región constante conservada (Ck o CH1) bajo condiciones PCR estándar. El producto PCR se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa, o mediante el kit de purificación PCR comercial para eliminar cebadores biotinilados no incorporados y PCR no específica.

EJEMPLO 2: Cribado de la Biblioteca

[000114] Se utilizó Transferencia con Filtro de Captura ("*Capture Filter Lift*") para el cribado primario. El cribado actual dimensionado es más de 3 veces más grande que el tamaño teórico de la biblioteca. Los candidatos se cribaron aún más mediante análisis ELISA de un solo punto. Los mejores ligantes ("*binders*") se confirmaron adicionalmente mediante titulación directa del antígeno usando el Factor D basándose en la concentración de Fab.

[000115] *Cribado con Transferencia de Captura*

[000116] Se empleó el Análisis de Transferencia con Filtro de Captura para el cribado primario de la unión de Fab al Factor D. Bacteriófagos de alta titulación se estriaron e incubaron a 37°C hasta el momento del uso (alrededor de 6-8 horas). Kappa anti-humano en cabra se diluyó a 10ug/ml en 10 ml PBST; se prepararon filtros de nitrocelulosa para placas de transferencia ("*lifting plaques*") de acuerdo con procedimientos estándar con placas de transferencia y luego se sumergieron en 10ml de amortiguador de bloqueo durante 2 horas en un agitador. Los filtros se enjugaron 3x con PBST. Los filtros se aplicaron a un césped de placa y se incubaron a temperatura ambiente (RT) durante aproximadamente 15-24 horas. A continuación se retiraron los filtros de las placas y se enjugaron con TBST 3x.

[000117] Factor D (50ug/ml) se diluyó en PBST a 0.1 ug/ml y se agregaron 4ml por filtro. Los filtros se incubaron en la solución durante 2 horas en un agitador a temperatura ambiente, seguido por enjuague 3x, cada vez 5 minutos. Se agregó 166-222-HRP diluido (1:10.000 con PBST) en un volumen de 4 ml por filtro y los filtros se incubaron durante 1 hora en un agitador. Los filtros se enjugaron 4x. Los filtros se secaron y luego se sumergieron en sustrato TMB, seguido por inmersión en agua para detener la reacción. Se identificaron los clones positivos.

EJEMPLO 3: Cribado con ELISA de Punto Único

[000118] Se utilizó una análisis ELISA de punto único para el cribado secundario. Placas Immulon II se recubrieron con Fab anti-humano en cabra (1:12.000, 50ul/pocillo) de un día para otro a temperatura ambiente. Al día siguiente las placas se lavaron 4x con lavador de placas. Se agregó amortiguador de bloqueo en un volumen de 100ul por pocillo y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura de la sala. Las placas se lavaron entonces 4x.

[000119] Cada Fab a cribarse se agregó en un volumen de 50ul por pocillo (o bien de la preparación periplasmática de 15ml o bien del sobrenadante) y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 4x, seguido por la adición de 50ul/pocillo de Factor D biotinilado a 0.01ug/ml. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se lavaron 4x. Se agregó estreptavidina-HRP (1:10.000 en PBST) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 5x y luego se desarrollaron agregando sustrato TMB a 50ul/pocillo. Se agregó amortiguador de detención ("*stop buffer*") en un volumen de 50ul luego de estar bien desarrollada (10-45 minutos) y luego se leyeron las placas a 450nm.

Ejemplo 4: Secuenciación de clones de anti-Factor D humanizados

[000120] Se secuenciaron 16 clones humanizados con excelente afinidad de unión para el Factor D humano (véase Tabla 1). Entre éstos, la posición 2 (100% humano) y 49 (100% ratón) en la cadena ligera, y la posición 93 (100% ratón) en la cadena pesada son altamente conservadas, indicando que son importantes en mantener la capacidad de unión del anticuerpo.

Tabla 1. Análisis de secuencias de aminoácidos de clones humanizados de

la biblioteca de humanización

VK	2	4	13	43	49	64	69	VH	2	9	38	93	97
Ratón	T	V	M	P	S	S	A		I	P	K	T	E
Humano	I	M	A	V	Y	G	T		V	S	R	V	A
7	I	M	M	V	S	S	T		I	P	K	V	E
30	I	V	A	V	S	S	A		V	P	K	T	E
45	I	V	M	V	S	G	A		I	S	R	V	E
46	I	V	M	V	S	S	T		I	S	R	V	E
47	I	V	A	V	S	S	T		I	S	R	V	E
48	I	V	M	V	S	S	T		V	P	R	V	E
50	I	V	M	V	S	G	A		V	P	R	T	E
51	I	M	M	V	S	G	T		I	S	K	T	E
56	I	V	A	V	S	G	T		V	P	K	T	E
57	I	M	M	V	S	S	A		V	S	R	V	E
58	I	V	M	P	S	G	A		V	P	R	V	E
59	I	V	A	P	S	S	T		V	P	K	V	E
60	I	V	M	P	S	G	T		V	P	R	V	E
63	I	V	M	V	S	S	T		V	S	R	T	E
74	I	V	M	V	S	S	T		I	S	R	V	E

[000121] El clon #56 se evaluó mediante análisis BIAcore y análisis de inhibición hemolítico. El análisis BIAcore mostró que el clon #56 tiene una afinidad similar al Factor D humano que el Fab 166-32 quimérico (véase Tabla 4). El análisis de inhibición hemolítico mostró que el clon #56 es en cierta forma más potente que el Fab 166-32 quimérico (véase Figura 6). El clon # 56 contiene dos residuos murinos en la estructura de cadena ligera y cuatro residuos murinos en la cadena pesada, (véase Tabla 1). Basándose en estos resultados, se llevó a cabo una optimización posterior.

Tabla 2. Análisis de secuencias de aminoácidos de anticuerpos optimizados de la biblioteca de humanización/optimización de CDR3s

Posiciones VK	2	4	13	43	49	64	69	CDR-L3	92	93	97	
166-32	T	V	M	P	S	S	A		D	N	T	
Plantilla Humana	I	M	A	V	Y	G	T					
104	I	V	M	P	S	S	T		D	S	T	
109	I	V	A	V	S	G	A		M	N	T	
111	I	V	A	V	S	G	T		D	S	T	
112	I	V	A	V	S	G	T		D	S	T	
114	I	V	A	V	S	G	T		D	C	T	
121	I	V	A	V	S	S	A		D	N	T	
125	I	V	A	P	S	S	T		D	N	T	
130	I	V	A	V	S	S	T		D	N	S	

Posiciones VH	2	9	38	93	97	CDR-H3	98	99	100
166-32	I	P	K	T	E		V	D	N
Plantilla Humana	V	S	R	V	A				
104	V	S	R	V	E		V	D	T
109	V	S	R	V	E		V	N	N
111	V	S	R	V	E		V	N	N
112	V	S	R	V	E		V	N	N
114	V	S	K	V	E		V	N	N
121	I	S	R	V	E		V	N	T
125	V	S	R	V	E		P	D	N
130	V	S	R	V	E		V	D	H

[000122] Los clones #111 y #114 se caracterizaron mediante análisis BIAcore (véase Tabla 4). Los clones #104, #111, #114 y #130 se caracterizaron así mismo mediante análisis de inhibición hemolítico (véase Figura 6). Estos clones tienen afinidades más elevadas que el 166-32 quimérico, y son más potentes que el Fab quimérico en inhibir la vía alternativa, como se muestra por el análisis de inhibición hemolítico (Figura 7). El clon #111 contiene los mismos dos residuos murinos en la cadena

ligera (posiciones 4 y 49) que el clon # 56. Contiene igualmente el residuo murino conservado en la posición 97 de la cadena pesada que se encuentra en el clon #56. Hay una mutación benéfica en las dos CDR3 de cadenas ligeras y pesadas en el clon #111. De dos bibliotecas independientes cribadas (biblioteca de humanización, y biblioteca de humanización /optimización de CDR3s), descubrimos que los mejores clones tienen residuos de consenso similares.

[000123] Para optimizar aún más la afinidad del clon #111, se construyó una biblioteca de anticuerpos introduciendo mutaciones individuales en las CDR-H1 y CDR-L2 simultáneamente. En síntesis, se empleó la metodología de mutagénesis dirigida al sitio para construir tales bibliotecas apareando oligonucleótidos que codifican mutaciones individuales a la plantilla del clon #111. Se secuenciaron un total de 24 clonas con muy alta afinidad al Factor D humano. Entre estos 24 clones, se identificaron varias mutaciones benéficas redundantes. Los clones #250, #315, #345 y #416 se seleccionaron mediante análisis BIAcore (véase Tabla 4). Los datos BIAcore mostraron que estos clones tienen una mayor afinidad al Factor D humano que el clon inicial #111. Los clones #250, #315, #348 y #416 se probaron igualmente en el análisis de inhibición hemolítico (véase Figura 6) e inhibición de la vía alternativa (Figura 7).

Ejemplo 5: Análisis de Hemólisis AP

[000124] Se determinó la función biológica de los clones humanizados utilizando el análisis de inhibición hemolítico y el análisis BIAcore (véase Ejemplo 6 a continuación). El análisis hemolítico se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente procedimiento. 20 μ l de glóbulos rojos de conejo diluidos 1:20 (RRBC - *rabbit red blood cells*) (0.5 ml + 9.5 ml amortiguador GVB/Mg-EGTA) en 20 ml de solución salina (0.9% NaCl) con una dilución de aproximadamente $1:2 \times 10^4$ se contaron con un contador Coulter. A continuación se ajustó la concentración de las células a alrededor de 2-5

28

$\times 10^4$ células/ml. Cada placa recibió alrededor de 500×10^6 /RRBC o alrededor de 1 ml RRBC/placa ($500 \times 10^6 / 2-5 \times 10^4$).

[000125] Las células se diluyeron en 6 ml amortiguador GVB/Mg-EGTA/placa, se mezclaron y se lavaron 3 veces agitando a 1360 rpm x 4 minutos a 4 °C. El sedimento celular RRBC se suspende en 3 ml amortiguador GVB/Mg-EGTA/placa y se conservó en hielo.

[000126] Suero humano congelado -80°C se descongeló justo antes del uso. El suero se diluyó a una concentración de 20% suero en amortiguador GVB/Mg-EGTA, 5 ml/placa (final es 10%) y se mantuvo en hielo.

Tabla 3

	1	2	3	S	SB
GVB/Mg-EGTA:	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul
mAb: 50 ul mix	50 ul	50 ul	50 ul	-----	-----
20% suero humano:	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul
Agitar 30 segundos a 5-6°, mantener luego a temperatura ambiente durante 7 minutos					
RBC de conejo:	30 ul	30 ul	30 ul		30 ul

[000127] Las muestras se agitaron durante 30 segundos a 5-6°C y luego durante 40 minutos a 37 °C. Se enfriaron las muestras a 5-6°C agitando simultáneamente y luego se centrifugaron a 2.000 rpm x 3 minutos a 4 °C. Aproximadamente 80 ul de sobrenadante se transfirieron a una placa de 96 pocillos de fondo plano y se leyó el valor OD a 590 nm usando un lector de placas estándar. La inhibición porcentual se calculó en la siguiente forma:
% Inhibición = $\{[(S-SB) - (U-SB)] / (S-SB)\} \times 100\%$. (U = muestra 1, 2 o 3 (columnas 1, 2 o 3 de Tabla 3, respectivamente).

74

Ejemplo 6: Análisis Cinético del Fab de Factor D anti-Humano mediante BiaCore

[000128] *Immobilización* – Factor D humano (Advanced Research Inc, 0.1 mg/ml) se inmovilizó directamente en la matriz ("*chip*") CM5 (BiaCore) empleando el método de acoplamiento con amina. El procedimiento se describe brevemente como el siguiente: (1) Flujo constante (PBS) es a 5 µl/min. (2) Inyección de 35 µl EDC/NHS (1:1). (3) Inyección de 35 µl de Factor D humano en amortiguador de acetato, pH 4.5. (4) Bloquear el grupo activado mediante inyección de 35 µl etolamina. (5) Limpiar la superficie por 5 µl 10 mM Glicina pH 1.5. El nivel de inmovilización del ligando (Factor D humano) es de alrededor de 1.000 RU. El ciclo de la prueba empleando un Factor D α-humano (huDi, 40 µl, 31.5 µg/ml) arrojó una respuesta relativa alrededor de 900 RU.

[000129] *Análisis Cinético* – Todos los Fabs de Factor D anti-humano se diluyeron en amortiguador PBS. Cada muestra se preparó en una serie de concentraciones: 12.5 nM, 25 nM, 50 nM, 75nM, 100 nM, 125 nM, y 150 nM, con pulsación de inyección de 40 µl con una alta tasa de adquisición. Se llevó a cabo regeneración aplicando una pulsación de 5 µl de 10 mM glicina a pH 1.5. Se obtuvieron parámetros cinéticos ajustando trazas de unión de Fabs a un modelo de unión 1:1 bajo pseudo cinética de primer orden usando Factor D de versión BIAevaluation.

Tabla 4 Resultados BIAcore

Clon Fab	ka (M-1s-1)	kd (s-1)	Kd (M)
Anti-factor D Fab 315	7.1x10 ⁵	2.7x10 ⁻⁴	3.7x10 ⁻¹⁰
Anti-factor D Fab 416	8.2x10 ⁵	1.8x10 ⁻⁴	3.3x10 ⁻¹⁰
Anti-factor D Fab 345	6.8x10 ⁵	3.5x10 ⁻⁴	5.1x10 ⁻¹⁰

25

Anti-factor D Fab 250	5.7×10^5	1.9×10^{-4}	3.3×10^{-10}
Anti-factor D Fab 56	3.6×10^5	9.8×10^{-4}	2.7×10^{-9}
Quimérico	4.4×10^5	1.2×10^{-3}	2.7×10^{-9}
Anti-factor D Fab 111	3.3×10^5	3.7×10^{-4}	1.14×10^{-9}

[000130] Los expertos en el arte reconocerán, o estarán en capacidad de verificar, empleando no más que experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las incorporaciones específicas de la invención descritas en esta especificación. Se pretende que tales equivalentes queden abarcados por las siguientes reivindicaciones.

Reivindicamos:

1. Un anticuerpo murino que comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 1.
2. Un anticuerpo murino que comprende una secuencia de dominio variable de cadena ligera SEQ ID NO: 2.
3. Un anticuerpo murino que comprende la secuencia de dominio variable de cadena pesada de la reivindicación 1 y la secuencia de dominio variable de cadena ligera de la reivindicación 2.
4. Un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17 y 18.
5. Un anticuerpo quimérico que comprende SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.
6. Un dominio variable de un anticuerpo humanizado que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada seleccionada del grupo conformado por: SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 10; y SEQ ID NO: 12.
7. Un dominio variable de un anticuerpo humanizado que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 11.
8. Un anticuerpo anti-Factor D humanizado que comprende la secuencia de dominio variable de SEQ ID NO: 5 y la secuencia de dominio variable en SEQ ID NO: 6.
9. Un anticuerpo anti-Factor D humanizado que comprende la secuencia de dominio variable de SEQ ID NO: 7 y la secuencia de dominio variable en SEQ ID NO: 8.

10. Un anticuerpo anti-Factor D humanizado que comprende la secuencia de dominio variable de SEQ ID NO: 9 y la secuencia de dominio variable en SEQ ID NO: 10.

11. Un anticuerpo anti-Factor D humanizado que comprende la secuencia de dominio variable de SEQ ID NO: 11 y la secuencia de dominio variable en SEQ ID NO: 12.

12. Un anticuerpo anti-Factor D humanizado, que tiene una cadena ligera variable que comprende una CDR-L1 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 16; una CDR-L2 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 17, 21, o 23, y una CDR-L3 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 18, 22 o 24.

13. Un anticuerpo anti-Factor D humanizado que tiene una cadena pesada variable que comprende una CDR-H1 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 13 o 25; una CDR-H2 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 14; y una CDR-H3 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 15 o 20.

14. Un polipéptido que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

QX₁QLVQSGX₂E LKKPGASVKV SCKASGYTFT SYGMNWVX₃QA
PGQGLEWMGW INTYTGETTYADDFKGRFVF SLDTSVSTAY
LQISSLKAED TAX₄YYCX₅REG GVNNWGQGTL VTVSS (SEQ ID
NO: 27),

en donde X₁ es I o V; X₂ es P o S; X₃ es K o R; X₄ es T o V; y X₅ es E o A.

15. Un polipéptido que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

DIQX₆TQSPSSLX₇SVGDRVTITCITSTDIDDDMNWYQQKPGKX₈PK
LLIX₉DGNTLRPGVPSRFSX₁₀SGSGX₁₁DFTLTISLQPEDVATYYCLQ
SDSLPYTFGQGKLEIK (SEQ ID NO: 26),

en donde X₆ es V o M; X₇ es M o A; X₈ es P o V; X₉ es S o Y; X₁₀ es S o

G y X₁₁ es A o T.

16. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 8, 10, o 12.

17. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 7, 9, o 11.

18. Un anticuerpo humanizado que comprende el polipéptido de la reivindicación 14.

19. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 18 que comprende además el polipéptido de la reivindicación 15 o 33.

20. Un fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, 18-19, 31 o 32.

21. Un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3.

22. Un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4.

23. Un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, 18-19, 31 o 32.

24. Un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17.

25. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 23.

26. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 24.

27. Una línea celular que comprende el vector de la reivindicación 25 o 26.

28. Una composición que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, 18 o 19.

29. Uso de la composición de la reivindicación 28 para tratar trastornos mediados por complemento.

30. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, en donde el trastorno es una enfermedad ocular tal como degeneración macular relacionada con la edad o retinopatía diabética.

31. Un dominio variable de la reivindicación 7 en donde el aminoácido en la posición 104 de SEQ ID NO: 7 es una valina o una leucina.

32. Un anticuerpo anti-Factor D humanizado de la reivindicación 9 que comprende la secuencia de dominio variable de SEQ ID NO: 7 en donde el aminoácido en la posición 104 de SEQ ID NO: 7 es una valina o una leucina y la secuencia de dominio variable de SEQ ID NO: 8.

33. Un polipéptido de la reivindicación 15 en donde el aminoácido en la posición 104 de SEQ ID NO: 26 es una valina o una leucina.

34. Un polipéptido de la reivindicación 17 en donde el aminoácido en la posición 104 de SEQ ID NO: 7 es una valina o una leucina.

35. El método de elaborar un anticuerpo anti-Factor D humanizado o su fragmento de cualquiera de las reivindicaciones 1 -13, 18-19, 31 o 32.

36. Un anticuerpo que compite con el anticuerpo 166-32 murino y/o el clon del anticuerpo anti-Factor D humanizado #56, #111, #250 o #416 y/o un anticuerpo que comprende el dominio variable o las secuencias HVR del clon del anticuerpo anti-Factor D humanizado #56, #111, #250 o #416.

37. Un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 166-32 murino y/o el clon del anticuerpo anti-Factor D humanizado #56, #111,

#250 o #416 y/o un anticuerpo que comprende el dominio variable o las secuencias HVR del clon del anticuerpo anti-Factor D humanizado #56, #111, #250 o #416.

P4028R1 WO
1/11

FIGURA 1A

Secuencia de Aminoácidos de la Cadena Pesada Variable del MAb 166-32
Murino

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINT
YTGETTYADDFKGRFVFSLETSASTAYLEINNLKNEDMATYFCEREGGVDNWG
QGTTLTVSS (SEQ ID NO: 1)

FIGURA 1B

Secuencia de Aminoácidos de la Cadena Ligera Variable del MAb 166-32
Murino

ETTVTQSPASLSMAIGKVTIRCITSTDIDDDMNWYQQKPGEPPKLLISGGNTRLR
PGVPSRFSSSGYGADVFVTIDNMLSEVDADYYCLQSDNLPYTFGGGTRLEIK
(SEQ ID NO: 2)

P4028R1 WO

2/11

FIGURA 2A

Secuencia de Ácido Nucleico Murino para la Región Variable de Cadena
Pesada del MAb 166-32

CAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACA
GTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTCACAACTATGGAATGA
ACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAA
ACACCTACACTGGAGAGACAACATATGCTGATGACTTCAAGGGACGGTTTGT
CTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAGCACTGCCTATTTGGAGATCAACAACCTCA
AAAATGAGGACATGGCTACATATTTCTGTGAAAGAGAGGGGGGGGTTGACAA
CTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 3)

FIGURA 2B

Secuencia de Ácido Nucleico Murino para la Región Variable de Cadena Ligera
del MAb 166-32

GAAACAACCTGTGACCCAGTCTCCTGCATCCCTGTCCATGGCTATAGGAGAAAA
AGTCACCATCAGATGCATAACCAGCACTGATATTGATGATGATATGAACTGGT
ACCAGCAGAAGCCAGGGGAACCTCCTAAGCTCCTTATTTCAAGGAGGCAATACT
CTTCGTCCTGGAGTCCCATCCCGATTCTCCAGCAGTGGCTATGGTGCAGATTTT
GTTTTTACAATTGACAACATGCTCTCAGAAGATGTTGCAGATTACTACTGTTTG
CAAAGTGATAACTTGCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAGGCTGGAAATAA
AA (SEQ ID NO: 4)

8

FIGURA 3 Comparación de la Plantilla de Cadena Pesada Humana con el MAb 166-32 Murino

	1	10	20	30	40	
Mu 166-32	Q	I Q L V Q S G	E L K K P G E T V K I S C K A S	G Y T F T N Y G M N W V	K Q A P G K G L K W M G	
Hu VI-4.1b+	<u>V</u>	<u>S</u>	A S V	G Y T F T S Y A M N	<u>R</u> Q	E
	50	52 a 53	60	65	70	80 82 a b c 83 90
Mu 166-32	W	I N T Y T G E T T Y A D D F K G R F V F S L E T S A S T A Y L E I N N L K N E D M A T Y F C E R				
Hu VI-4.1b+	<u>W</u>	<u>I N T N T G N P T Y A Q G F T G</u>				<u>V</u> Y <u>A</u>
	95	103	110	113		
Mu. 166-32	E	G G V D N W G Q G T T L T V S S				
Hu VI-4.1b+	<u>Y F D Y</u>	<u>L V</u>				

Kabat CDR: subrayada. **Negrita**/Cursiva: Chothia CDR1.

FIGURA 4

Comparación de la Plantilla de Cadena Ligera Humana con el MAb 166-32 Murino

1 10 20 30 40
Mu. 166-32 E T V T Q S P A S L S M A I G E K V T I R C I T S T D I D D D M N W Y Q Q K P G E E P K L L I
HUTemp DPK4 D I Q M S S V D R T R A S Q G I S N Y L A K V

[illegible]

Mu. 166-32 T F G G T R L E I K
HUtemp JK2 T Q K (JK2)

85

P4028R1 WO

5/11

FIGURA 5

#56 VK

DIQVTQSPSSLSASVRDRVITITCistdiddmnWYQQKPGKVPKLLISgntlrpGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISSLQPEDVATYYCqsdslpytFGQGTKLEIK

#56 VH

QVQLVQSGPELKKPGASVKVSCKASgytftnygmWVKQAPGQGLEwmgwintytgettyaddfkGRFVF
SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTATYYCEReggvnnWGQGTLTVSS

#111 VK

DIQVTQSPSSLSASVGDRVITITCistdiddmnWYQQKPGKVPKLLISgntlrpGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISSLQPEDVATYYCqsdslpytFGQGTKLEIK

#111 VH

QVQLVQSGPELKKPGASVKVSCKASgytftnygmWVRQAPGQGLEwmgwintytgettyaddfkGRFVF
SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCEReggvnnWGQGTLTVSS

#250 VK

DIQVTQSPSSLSASVGDRVITITCistdiddmnWYQQKPGKVPKLLIShgntlrpGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISSLQPEDVATYYCqsdslpytFGQGTKLEIK

#250 VH

QVQLVQSGPELKKPGASVKVSCKASgytftnygmWVRQAPGQGLEwmgwintytgettyaddfkGRFVFS
LDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCEReggvnnWGQGTLTVSS

#416 VK

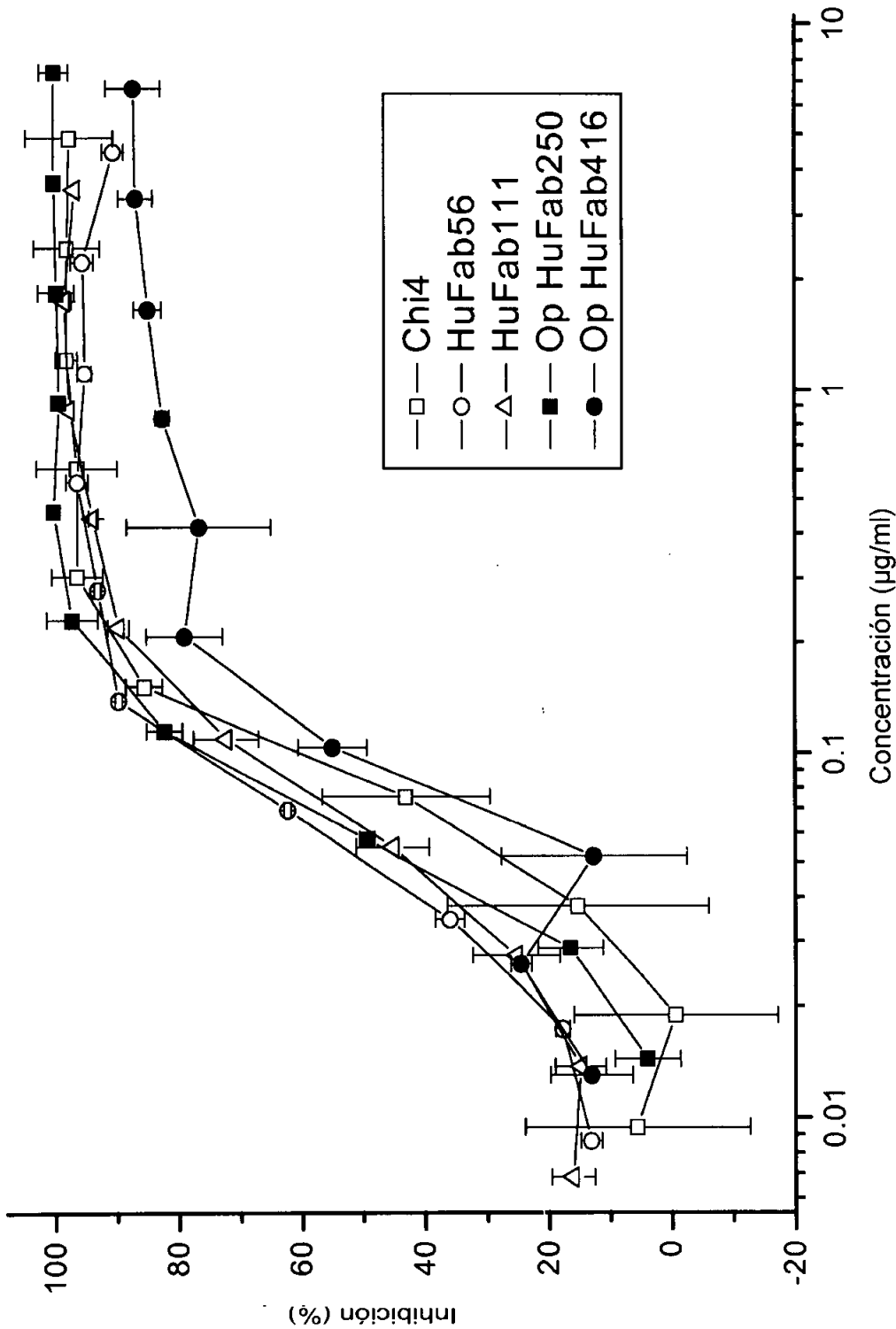
DIQVTQSPSSLSASVGDRVITITCistdiddmnWYQQKPGKVPKLLISdgntlrpGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISSLQPEDVATYYCqsdslpytFGQGTKLEIK

#416 VH

QVQLVQSGPELKKPGASVKVSCKASgytftsygmWVRQAPGQGLEwmgwintytgettyaddfkGRFVF
SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCEReggvnnWGQGTLTVSS

P4028R1 WO
6/11

FIGURA 6
Anti-FD HuFabs Optimizados Inhiben Hemólisis AP

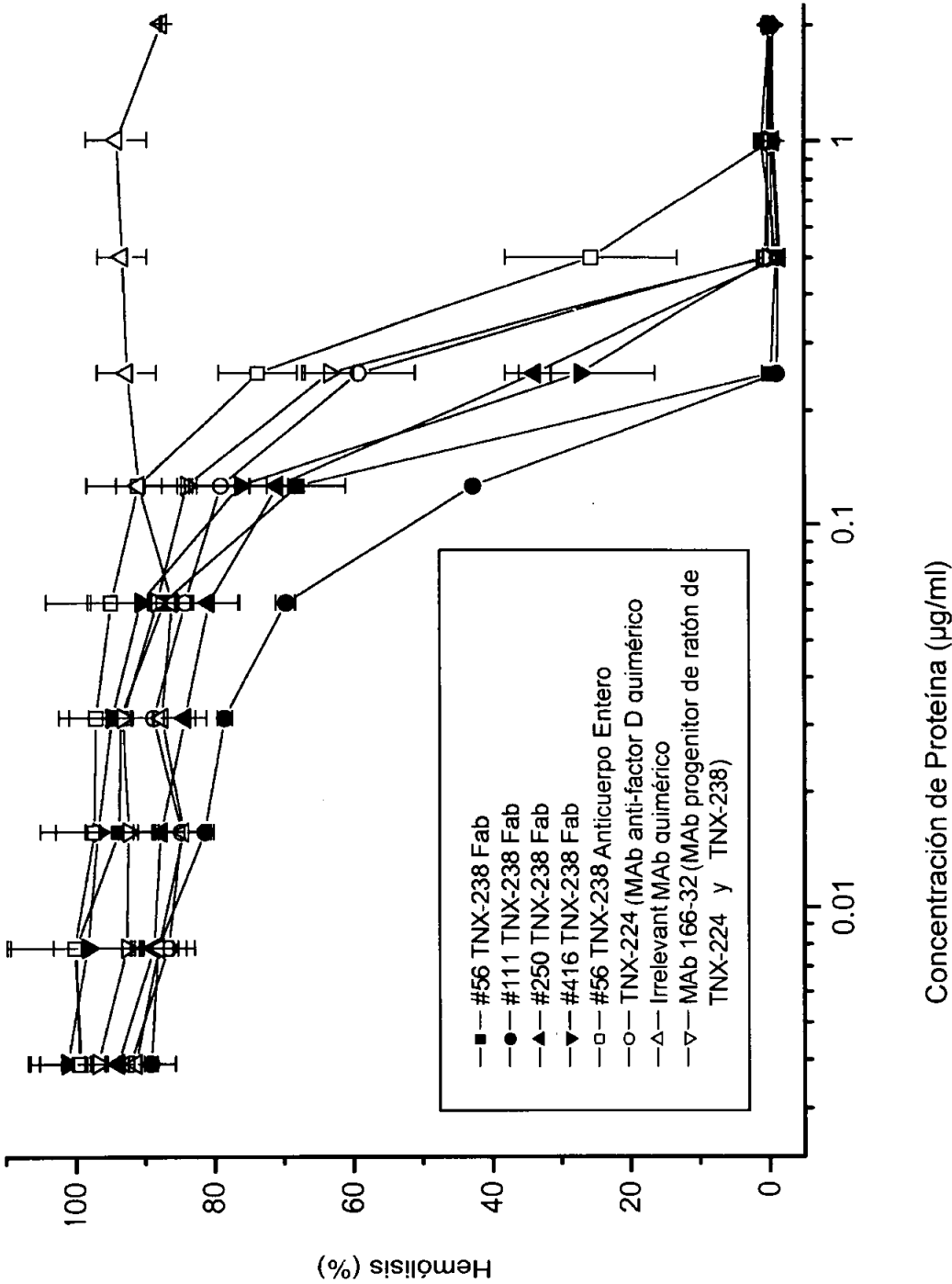


OptimizedHuFab-AP1a/010202

P4028R1 WO
7/11

FIGURA 7

Inhibición de la Actividad de Complemento Alternativa de Suero Humano por
Diferentes Constructos Fab Humanizados TNX-238 en Análisis Hemolítico



HuFabAP1/2.28.03

FIGURA 8A

I	A	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	I	-HI-	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	-H2-																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
	B	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	I	-HI-	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	-H2-																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
	C	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	I	-HI-	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	-H2-																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
	D	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	I	-HI-	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	-H2-																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
II	A	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	G	S	V	S	-HI-	W	I	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	I	G	-H2-																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
	B	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	G	S	V	S	-HI-	W	I	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	I	-H2-																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
	C	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	G	S	V	S	-HI-	W	I	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	I	-H2-																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
	D	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	G	S	V	S	-HI-	W	I	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	I	-H2-																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
III	A	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	-HI-	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	-H2-																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
	B	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	-HI-	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	-H2-																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
	C	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	-HI-	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	-H2-																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
	D	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	-HI-	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	-H2-																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
VII	A	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	S	E	L	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	I	-HI-	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	-H2-																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
	B	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	S	E	L	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	I	-HI-	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	-H2-																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
	C	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	S	E	L	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	I	-HI-	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	-H2-																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
	D	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	S	E	L	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	I	-HI-	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	-H2-																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
Acceptor																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	</

89

P4028R1 WO
9/11

FIGURA 8B

RVTITADTSTSTAYMELSSLSRSEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NO: 28
RVTITADTSTSTAYMELSSLSRSEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NO: 29
RVTITADTSTSTAYMELSSLSRSEDTAVYYCA	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NO: 30
RVTITADTSTSTAYMELSSLSRSEDTAVYYC	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NO: 31
RVTISVDTSKNQFSLKLSSTAAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NO: 32
RVTISVDTSKNQFSLKLSSTAAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NO: 33
RVTISVDTSKNQFSLKLSSTAAEDTAVYYCA	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NO: 34
RVTISVDTSKNQFSLKLSSTAAEDTAVYYC	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NO: 35
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NO: 36
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NO: 37
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NO: 38
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NO: 39
RFVFS LDTSVSTAYLQISSLKAEEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTSLTVSS	SEQ ID NO: 55
RFVFS LDTSVSTAYLQISSLKAEEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTSLTVSS	SEQ ID NO: 56
RFVFS LDTSVSTAYLQISSLKAEEDTAVYYCA	-H3-	WGQGTSLTVSS	SEQ ID NO: 57
RFVFS LDTSVSTAYLQISSLKAEEDTAVYYC	-H3-	WGQGTSLTVSS	SEQ ID NO: 58
RFTISADTSTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NO: 40
RFTISADTSTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NO: 41
RFTISADTSTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NO: 42
RFTISADTSTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NO: 43
RFTISADTSTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NO: 44
RFTISADTSTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NO: 45
RFTISADTSTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NO: 46

P4028R1 WO
10/11

FIGURA 9A

kv1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	-L1-	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	-L2-	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
kv2	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	-L1-	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	-L2-	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A
kv3	E	I	V	L	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	-L1-	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	-L2-	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	R	L	E	P
kv4	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	-L1-	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	-L2-	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	A

P4028R1 WO
11/11

FIGURA 9B

EDFATYYC	-L3-	FGQGTKEIK	SEQ ID NO: 47
EDVGYYC	-L3-	FGQGTKEIK	SEQ ID NO: 48
EDFAVYYC	-L3-	FGQGTKEIK	SEQ ID NO: 49
EDVAVYYC	-L3-	FGQGTKEIK	SEQ ID NO: 50

PATENT COOPERATION TREATY

Response to Written Opinion (of ISA) due 9/26/08

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

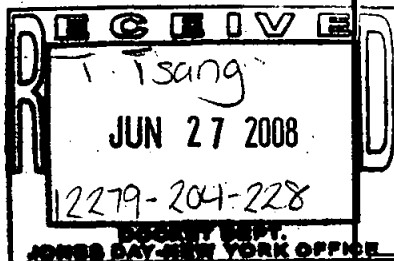
JONES DAY

Attn. George, Nikolaos

222 East 41st Street

New York, NY 10017

ETATS-UNIS D'AMERIQUE

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing (day/month/year)	26/06/2008
Applicant's or agent's file reference 12279-204-228	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US2007/083172	International filing date (day/month/year) 31/10/2007
Applicant GENENTECH, INC.	

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3. ☐ **With regard to the protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:
- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Sabina Maretto
--	--

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 12279-204-228	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2007/083172	International filing date (day/month/year) 31/10/2007	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 02/11/2006
Applicant GENENTECH, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☒ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III)

4. With regard to the **title**,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant
☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

HUMANIZED ANTI-FACTOR D ANTIBODIES

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 6
☒ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
 b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

94
international application No.

PCT/US2007/083172

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- ☒ on paper
- ☒ in electronic form
- c. time of filing/furnishing
- ☒ contained in the international application as filed
- ☒ filed together with the international application in electronic form
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

95

national application No

PCT/US2007/083172

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/36 A61P37/00 A61P27/02

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

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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TANHEHCO E J ET AL: "The anti-factor D antibody, Mab 166-32, inhibits the alternative pathway of the human complement system." TRANSPLANTATION PROCEEDINGS AUG 1999, vol. 31, no. 5, August 1999 (1999-08), pages 2168-2171, XP002454359 ISSN: 0041-1345 page 2168, left-hand column page 2170, right-hand column ----- -/--	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 referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 June 2008

Date of mailing of the international search report

26/06/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Flao, Katell

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2007/083172

96

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HARBOE M ET AL: "The quantitative role of alternative pathway amplification in classical pathway induced terminal complement activation." CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY DEC 2004, vol. 138, no. 3, December 2004 (2004-12), pages 439-446, XP002454358 ISSN: 0009-9104 abstract page 445, left-hand column -----	1-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/083172

99

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 29 and 30 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

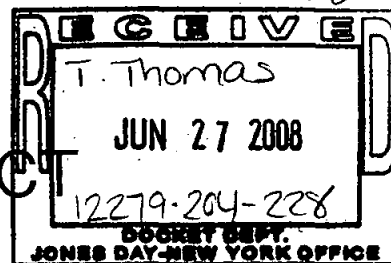
1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Response to written
Opinion (of ISA) Due 9/26/08

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY



To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2007/083172

International filing date (day/month/year)
31.10.2007

Priority date (day/month/year)
02.11.2006

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/36 A61P37/00 A61P27/02

Applicant
GENENTECH, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaag 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3016

Date of completion of
this opinion

See form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Le Flao, Katell

Telephone No. +31 70 340-1040



WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

99
International application No.
PCT/US2007/083172

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☒ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2007/083172

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 29,30

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 29,30 relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13^{ter}.1(a) or (b).

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See Supplemental Box for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2007/083172

101

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-4</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-37</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-37</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2007/083172

Re Item III

Claims 29 and 30 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the patentability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Reference is made to the following documents:

- D1: TANHEHCO E J ET AL: "The anti-factor D antibody, Mab 166-32, inhibits the alternative pathway of the human complement system." TRANSPLANTATION PROCEEDINGS, vol. 31, no. 5, August 1999, pages 2168-2171, XP002454359
- D2: HARBOE M ET AL: "The quantitative role of alternative pathway amplification in classical pathway induced terminal complement activation." CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, vol. 138, no. 3, December 2004, pages 439-446, XP002454358

For the assessment of the present claims 29 and 30 on the question whether they are patentable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as patentable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Novelty

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1-4 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.

The document D1 discloses (the references in parentheses applying to this document) the monoclonal antibody 166-32 which inhibits Factor D (p.2168, left-column, §2-§3). Even if the sequences of its heavy and light chain variable domains are not disclosed in D1, they are

✖ ✖

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2007/083172

considered to be intrinsic properties of the antibody, thereby anticipating the novelty of claims 1-4. Discovering a new feature of a known product is indeed not establishing novelty of the product.

The same reasoning applies with D2, which is also disclosing the antibody 166-32 and its selective blockade of the alternative pathway of complement activation (see the abstract).

Inventive step

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 5-37 does not involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

The document D1 is regarded as being the closest prior art to the subject-matter of claim 5, and discloses the murine anti Factor D antibody 166-32 capable of inhibiting Factor D. The subject-matter of claim 5 therefore differs from this known antibody in that it is a chimeric antibody. The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as providing an alternative form of a known antibody.

The solution proposed in claim 5 of the present application cannot be considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT) for the following reasons. Providing a chimeric or humanized antibody is considered to be a matter of routine. Without unexpected properties "derivatives" of a murine antibody are not inventive.

The same reasoning applies, mutatis mutandis, to the subject-matter of the corresponding independent claims 8-11, which therefore are also considered not inventive. The same applies to dependent claims 19-37.

Present claims 6, 7 and 12-18 are not defining antibodies by a heavy chain variable domain AND a light chain variable domain. Those claims are therefore not solving the problem posed, thereby not involving an inventive step.

Re Item VIII

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2007/083172

It is clear from the description on pages 2 that the following features are essential to the definition of the invention:

- (1) the antibody is an anti Factor D antibody
- (2) it contains a heavy chain variable region and a light chain variable region

Since independent claims 1, 2, 4-7, 14-18, 21 and 22 do not contain these features they do not meet the requirement following from Article 6 PCT taken in combination with Rule 6.3(b) PCT that any independent claim must contain all the technical features essential to the definition of the invention.

The clone numbers used in claims 36 and 37 are internal designations having no clear meaning, thereby rendering the definition of these claims unclear, Article 6 PCT.

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information

For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.

Amending claims under Art. 19 PCT

Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.

Filing a demand for international preliminary examination

In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/ WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT).

If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).

Filing informal comments

After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.

End of the international phase

At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPER (international preliminary examination report).

Relevant PCT Rules and more information

Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003

Bitte beachten Sie, dass angeführte Nichtpatentliteratur (wie z. B. wissenschaftliche oder technische Dokumente) je nach geltendem Recht dem Urheberrechtsschutz und/oder anderen Schutzarten für schriftliche Werke unterliegen könnte. Die Vervielfältigung urheberrechtlich geschützter Texte, ihre Verwendung in anderen elektronischen oder gedruckten Publikationen und ihre Weitergabe an Dritte ist ohne ausdrückliche Zustimmung des Rechtsinhabers nicht gestattet.

Veillez noter que les ouvrages de la littérature non-brevets qui sont cités, par exemple les documents scientifiques ou techniques, etc., peuvent être protégés par des droits d'auteur et/ou toute autre protection des écrits prévue par les législations applicables. Les textes ainsi protégés ne peuvent être reproduits ni utilisés dans d'autres publications électroniques ou imprimées, ni rediffusés sans l'autorisation expresse du titulaire du droit d'auteur.

Please be aware that cited works of non-patent literature such as scientific or technical documents or the like may be subject to copyright protection and/or any other protection of written works as appropriate based on applicable laws. Copyrighted texts may not be copied or used in other electronic or printed publications or re-distributed without the express permission of the copyright holder.



The Anti-Factor D Antibody, MAb 166-32, Inhibits the Alternative Pathway of the Human Complement System

E.J. Tanhehco, K.S. Kilgore, D.A. Liff, K.L. Murphy, M.S. Fung, W.N. Sun, C. Sun, and B.R. Lucchesi

ACTIVATION of the complement system contributes to hyperacute rejection and may occur as a result of binding of complement-fixing antibodies, the direct activation of complement via the alternative pathway on foreign cell surfaces, and/or the failure of complement regulation by the foreign organ.¹ Depending on the particular species-species interaction, complement activation, either through the classical or alternative pathway predominates, although in some cases both pathways may be operative.² Reperfusion of a xenograft results in the depletion of both xenoreactive antibodies and complement from the recipient's serum.³ Previous studies have shown that hyperacute rejection can occur in the absence of anti-donor antibodies via activation of the alternative pathway.⁴

Factor D, a serine protease, is essential for the activation of the alternative pathway of complement activation.⁵ The enzyme normally is found in low concentrations in the circulation.⁶ Its importance is reflected in that nine times the physiologic concentration of factor D is necessary for it to become non-rate-limiting, thereby making the enzyme an ideal target for regulation of the alternative pathway.⁷ Depletion of factor D from human serum prevents lysis of rabbit erythrocytes.⁸ Monoclonal antibodies against factor D also inhibit rabbit erythrocyte hemolysis by human serum as well as prevent the cleavage of C3 to C3b by cobra venom factor.⁹

We previously demonstrated that damage to the rabbit myocardium perfused in the presence of human plasma is due to the activation of the alternative pathway of the complement cascade.¹⁰ We employed this model in the present study. The primary purpose of this investigation was to determine if inhibition of factor D, with the specific monoclonal antibody (MAb 166-32) could prevent activation of human complement. The efficacy of MAb 166-32 is demonstrated in this study, as evidenced by a reduction in the extent of organ damage in an experimental model mimicking the phenomenon of hyperacute organ rejection.

METHODS

Guidelines for Human and Animal Research

The procedures used in this study are in agreement with the guidelines of the Institutional Review Board of the University of Michigan and with the regulations of the United States Department of Health and Human Services for the Protection of Human

Research Subjects (part 46 of title 45 of the Code of Federal Regulations, as amended); and the University of Michigan Committee on the Use and Care of Animals. Veterinary care was provided by the University of Michigan Unit for Laboratory Animal Medicine. The University of Michigan is accredited by the American Association of Accreditation of Laboratory Animal Health Care, and the animal care use program conforms to the standards in "The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals," DHEW Publ. No. (NIH) 86-23.

Antibodies

MAb 166-32, MAb G3-519, and MAb 137-76 were provided by Tanox, Inc. (Houston, Tex). MAb 166-32 is murine IgG₁, kappa-specific to human factor D. The antibody was generated by immunizing male A/J mice with human factor D purified from human serum. MAb G3-519 is a murine IgG₁, kappa-specific to HIV-1 external glycoprotein gp120. The latter antibody was used as an isotype-matched negative control in the study. MAb 137-76 is a murine IgG₁, kappa-specific to human C5 and inhibits complement-mediated hemolysis.

Preparation of Human Serum

Whole blood was collected in vacutainers and allowed to clot at room temperature for 15 minutes. The vacutainers were then centrifuged at 1500 × g for 20 minutes at 4°C to separate the serum from other blood elements. The serum was snap-frozen and stored at -80°C until use.

Human Factor D ELISA

The reactivity of MAb 166-32 with purified human factor D (Advanced Research Technologies, San Diego, Calif) was tested by an enzyme-linked immunoassay (ELISA). Each well of a microtest plate was coated with purified human factor D. The nonspecific sites in the wells were then saturated with a blocking/dilution buffer (phosphate-buffered saline containing 0.05% Tween 20 and 2% BSA). Serially diluted MAb 166-32 was added to the wells. As a negative control, anti-HIV gp120 MAb G3-519 was used. The

From the Department of Pharmacology, University of Michigan Medical School (E.J.T., K.S.K., D.A.L., K.L.M., B.R.L.), Ann Arbor, Michigan and Tanox, Inc. (M.S.F., W.N.S., C.S.), Houston, Texas.

This work was supported by Tanox, Inc., Houston, Texas.

Address reprint requests to Benedict R. Lucchesi, MD, PhD, Dept. of Pharmacology, University of Michigan, 1301 MSRB III, Ann Arbor, MI 48109-0632, E-mail: benluc@umich.edu.

0041-1345/99/\$-see front matter
PII S0041-1345(99)00297-3

2168

© 1999 by Elsevier Science Inc.
655 Avenue of the Americas, New York, NY 10010

Transplantation Proceedings, 31, 2168-2171 (1999)

bound antibody was detected by incubating the wells with diluted horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG. Peroxidase substrate solution containing 0.1% 3', 3' 5', 5'-tetramethyl benzidine (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) and 0.003% H₂O₂ was added to each well for color development. The reaction was stopped by addition of 2 mole H₂SO₄, and optical density (OD) measured at 450 nm.

Alternative and Classical Pathway Hemolytic Assays

Hemolytic assays were used to study the activity of MAb 166-32 in inhibiting complement activation. For the alternative pathway, normal rabbit red blood cells (RBCs) were used and incubated with 10 mM EGTA to inhibit the classical pathway.¹¹ Serially diluted MAb 166-32 was added to EGTA-treated human serum in duplicate wells of a microtest plate. The final serum concentration was 90%. For the negative control, the anti-HIV gp 120 MAb G3-519 was used. Washed rabbit RBCs were then added to each well and incubated for 30 minutes at 37°C. Supernatants were then collected for measurement of OD at 405 nm. The percent inhibition of hemolysis is defined as $100 \times [(OD_{\text{without MAb}} - OD_{\text{serum color background}}) - (OD_{\text{with MAb}} - OD_{\text{serum color background}})] / (OD_{\text{without MAb}} - OD_{\text{serum color background}})$.

Chicken RBCs were sensitized with rabbit anti-chicken RBC antibody (Accurate Chemical and Scientific Corp., San Diego, Calif) and used for the classical pathway hemolytic assay. Serially diluted MAb 166-32 was mixed with 3% human serum in microtest plate wells. A neutralizing anti-human C5 MAb 137-76 was used as a positive control; and MAb G3-519 was used as a negative control. Sensitized chicken RBCs were added to the mixture, and supernatants were collected for measurement of OD at 405 nm. The percent inhibition of hemolysis was calculated as described above.

Langendorff Perfused Rabbit Heart

Male, New Zealand White rabbits (2.2 to 2.4 kg) were euthanized by cervical dislocation. The hearts were perfused with modified, oxygenated Krebs-Henseleit buffer on a Langendorff apparatus as described previously.¹⁰ Coronary perfusion, left ventricular end-diastolic, and left ventricular developed pressures were monitored.

Experimental Protocol

The control group (group 1) consisted of hearts perfused with 4% human plasma in the presence of 0.3 µg/mL of MAb G3-519 (*n* = 6). Treatment group (group 2) consisted of hearts perfused with 4% human plasma in the presence of 0.3 µg/mL MAb 166-32 (*n* = 6). The percentage of human plasma was chosen because it severely impaired myocardial function over a reasonable length of time and allowed one to assess the efficacy of a potential inhibitor of complement activation as reflected by alterations in cardiac function.

Measurement of Bb: A Determinant of Alternative Pathway Activation

The concentration of complement component Bb in the lymphatic fluid was measured using a commercially available ELISA kit (Quidel Corp., San Diego, Calif).

Membrane Attack Complex Immunofluorescence: Evidence of Complement Activation

Heart sections were incubated with 1% BSA to minimize nonspecific staining. Sections were incubated with a murine anti-human

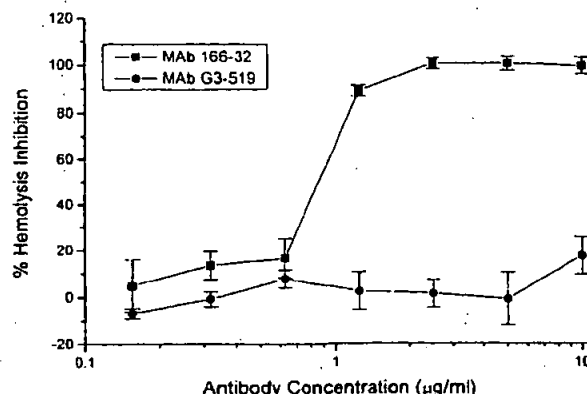


Fig 1. Inhibition of alternative pathway hemolysis by MAb 166-32 in 90% human serum.

membrane attack complex (MAC) monoclonal antibody (Quidel Corp.) then incubated with a goat anti-murine FITC conjugated antibody (Sigma Chemical Co.) The slides were then observed under a fluorescent microscope.

Statistical Analysis

The data presented in the text and figures are expressed as mean $\pm$ SEM followed by Student's *t* test for the indicated number of determinations. *P* < .05 was considered significant and is denoted by an asterisk in the figures.

RESULTS

Anti-Factor D Activity and Inhibition of Complement-Mediated Hemolysis

MAb 166-32 bound factor D in a dose-dependent manner in the ELISA, whereas the irrelevant control antibody, G3-519, did not display reactivity with human factor D.

MAb 166-32 inhibited the lysis of rabbit RBCs via the alternative complement pathway in 90% human serum (Fig 1). MAb 166-32 did not inhibit the lysis of sensitized chicken RBCs via the classical pathway, whereas the anti-human C5 MAb 137-76 was able to effectively prevent hemolysis in this assay. The results indicate that MAb 166-32 is specific against human factor D and is an effective inhibitor of the alternative pathway of human complement activation.

Hemodynamic Variables of Rabbit Hearts Perfused With Human Plasma

MAb 166-32 attenuated the increase in coronary perfusion pressure CPP when compared to hearts treated with MAb G3-519. A rise in CPP indicates coronary vascular resistance which is often associated with myocardial tissue damage.

Rabbit isolated hearts perfused in the presence of MAb 166-32 (0.3 µg/mL) maintained left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) when exposed to 4% human plasma, in marked contrast to the results obtained with MAb G3-519 (0.3 µg/mL) (Fig 2). The latter group of

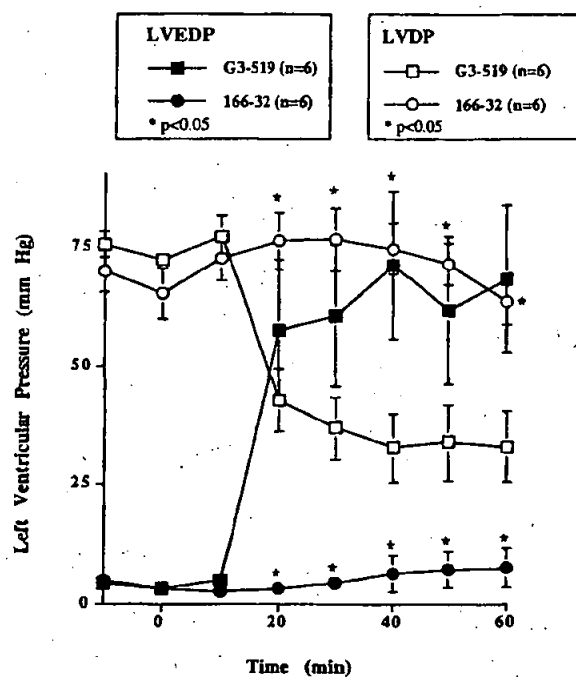


Fig 2.

hearts developed a progressive increase in LVEDP after exposure to 4% human plasma indicating contracture or a failure of the ventricle to relax during diastole (Fig 2). MAb 166-32 (0.3 μ g/mL) also attenuated the decrease in left-ventricular developed pressure (LVDP) compared to hearts treated with MAb G3-519 (0.3 μ g/mL) after exposure to 4% human plasma (Fig 2).

The data indicate that MAb 166-32 protects the rabbit isolated hearts from human complement-mediated injury as manifested by an overall maintenance of myocardial function after challenge with human plasma.

Bb Content of Lymphatic Effluent From Isolated Hearts

Factor D catalyzes the cleavage of bound factor B, yielding the Ba and Bb fragments. The concentration of Bb present serves as an index of factor D activity. Ten minutes after perfusion with 4% human plasma and at every time point thereafter, a significantly ($P < .05$) lower concentration of Bb was present in lymphatic effluents from hearts treated with MAb 166-32 as compared to hearts treated with MAb G3-519 (Fig 3).

MAC Immunofluorescence

Heart sections from MAb 166-32 and MAb G3-519 treated hearts were examined for human MAC deposition via immunofluorescence staining. MAb 166-32 treated hearts

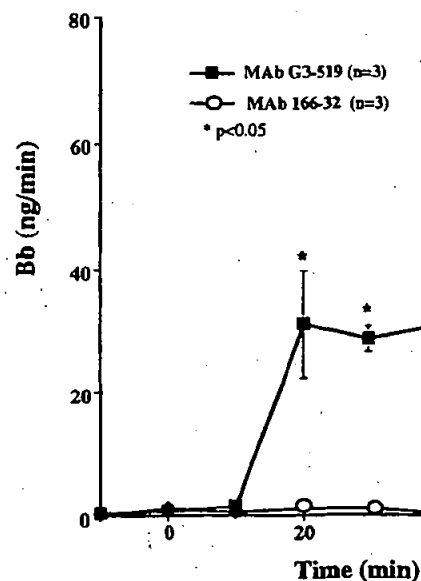


Fig 3.

exhibited a reduction in MAC deposition as compared to MAb G3-519 treated hearts.

DISCUSSION

Previous studies have shown that both depletion of factor D from human plasma and anti-factor D antibody inhibit lysis of rabbit erythrocytes by human plasma.^{8,9} The present study extends these observations by demonstrating the efficacy of MAb 166-32 in inhibiting activation of the human complement system, as evidenced by preventing tissue injury in human plasma perfused rabbit hearts. The results of this study indicate that MAb 166-32, by blocking the catalytic activity of factor D, specifically inhibits the alternative complement pathway.

The use of MAb 166-32 may provide an effective means of inactivating the alternative pathway of complement, as opposed to previous methods of factor D depletion and heat treatment of plasma. Inhibition of the alternative pathway in this manner leaves the components of the classical pathway intact, which may be desirable under certain experimental or clinical situations.

Inhibition of complement activation has been shown to prolong the survival of xenografts.¹² MAb 166-32 could potentially be used as an adjunctive therapeutic agent to protect xenografts from destruction by human plasma. Studies are underway to determine the ability of MAb 166-32 to inhibit complement activation in vivo.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Tanox, Inc. for their generous donation of MAb 166-32 and MAb G3-519.

REFERENCES

1. Platt JL, Bach FH: Transplantation 52:937, 1991
2. Takahashi T, Saadi S, Platt JL: Immunol Res 16:273, 1997
3. Gewurtz H, Clark DS, Finsta WD, et al: Ann NY Acad Sci 129:673, 1966
4. Johnston PS, Lim SM, Wang L, et al: Transplant Proc 23:877, 1991
5. Volanakis JE: Curr Topics Microbiol Immunol 153:1, 1989
6. Barnum SR, Niemann MA, Kearney JF, et al: J Immunol Meth 67:303, 1984
7. Lesavre PH, Muller-Eberhard HJ: J Exp Med 148:1498, 1978
8. Sturfelt G, Sjöholm AG, Truedsson L: Immunol Lett 20:23, 1989
9. Pascual M, Cantana E, Spertini F, et al: J Immunol Me 127:263, 1990
10. Gralinski MR, Wiater BC, Assenmacher AN, et al: Immunopharmacology 34:79, 1996
11. Whaley K, North J: In Dodds AW, Sim RB, eds: Complement: A Practical Approach. Oxford University Press: Oxford, 1997, p. 15
12. Makrides SC: Pharmacological Rev 50:59, 1998

The quantitative role of alternative pathway amplification in classical pathway induced terminal complement activation

HARBOE*, G. ULVUND*, L. VIENT†, M. FUNG† & T. E. MOLLNES* *Institute of Immunology, Rikshospitalet University Hospital, NO-0027 Oslo, Norway and †Tanox Inc, Houston, Texas 77025, USA

(Accepted for publication 20 August 2004)

SUMMARY

Complement activation with formation of biologically potent mediators like C5a and the terminal C5b-9 complex (TCC) contributes essentially to development of inflammation and tissue damage in a number of autoimmune and inflammatory conditions. A particular role for complement in the ischaemia/reperfusion injury of the heart, skeletal muscle, central nervous system, intestine and kidney has been suggested from animal studies. Previous experiments in C3 and C4 knockout mice suggested an important role of the classical or lectin pathway in initiation of complement activation during intestinal ischaemia/reperfusion injury while later use of factor D knockout mice showed the alternative pathway to be critically involved. We hypothesized that alternative pathway amplification might play a more critical role in classical pathway-induced C5 activation than previously recognized and used pathway-selective inhibitory mAbs to further elucidate the role of the alternative pathway. Here we demonstrate that selective blockade of the alternative pathway by neutralizing factor D in human serum diluted 1:2 with mAb 166-32 inhibited more than 80% of C5a and TCC formation induced by solid phase IgM and solid- and fluid-phase human aggregated IgG via the classical pathway. The findings emphasize the influence of alternative pathway amplification on the effect of initial classical pathway activation and the therapeutic potential of inhibiting the alternative pathway in clinical conditions with excessive and uncontrolled complement activation.

Keywords complement inflammation autoimmunity factor D alternative pathway activation

INTRODUCTION

Complement system with its central position in innate and adaptive immunity mediates a variety of effector functions. During the past decades it has become evident that it is also an important mediator of tissue damage in disease [1,2], in particular in ischaemia/reperfusion (I/R) injury [3,4]. Clinical evidence points to complement and immune complexes as critical players in mediators of reperfusion injury [5]. Intestinal I/R injury can also be initiated by clonally specific natural IgM antibodies via the classical pathway [6].

Results from earlier studies using C3 and C4 knockout (–/–) mice suggested an important role of the classical or lectin pathway during complement activation during intestinal I/R injury. However, in a separate study in the same model using factor D knockout mice the alternative pathway was shown to be critically involved in the I/R injury [7]. We hypothesized that absence of amplification via the alternative pathway in factor D –/– mice

could reduce the inflammatory response and tissue injury triggered by initial activation of the classical pathway and used pathway-selective inhibitory monoclonal antibodies (mAbs) to further elucidate the role of the alternative pathway in the activation of the complement system. Selective blockade of the alternative pathway was induced by neutralizing factor D with mAb 166-32 [8,9] and the classical pathway was blocked by anti-C2 mAb 175-62 after initial activation of the classical pathway induced by solid phase IgM and solid- and fluid phase human aggregated IgG.

MATERIALS AND METHODS

Monoclonal antibodies

Mouse mAbs against human factor D (clone 166-32, IgG1), C2 (clone 175-62, IgG1), and an isotype-matched control mAb (clone G3-519, anti-HIV gp120, IgG1) were generated and purified under identical conditions as described previously [8,9].

Normal human serum

Complement-sufficient normal human serum (NHS) was collected from five healthy volunteers and stored as aliquots at

Correspondence: Professor Tom Eirik Mollnes, Institute of Immunology, Rikshospitalet University Hospital, NO-0027 Oslo, Norway.
mail: t.e.mollnes@labmed.uio.no

-70°C. To approach physiological conditions NHS was tested at a final dilution as low as 1 : 2 and in further two-fold dilutions. In activation and inhibition experiments, the amounts of activating substance or purified antibody in the well are recorded as transformed to amount/ml of undiluted serum.

Complement reagents

C1q depleted (C1qD) human serum and purified human C1q were obtained from Quidel (San Diego, CA, USA), C2-depleted (C2D) human serum and factor B-depleted (fBD) human serum from Advanced Research Technologies (San Diego, CA, USA).

Assay of classical pathway complement activation by human IgM on solid phase

The assay was performed according to Roos *et al.* [10] with slight modifications. Purified polyclonal human IgM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4, at 40 µg/ml NHS and in further two-fold dilutions, were coated on Costar 3590 flat-bottomed polystyrene 96-well plates (Corning Inc, Corning, NY, USA) overnight at 20°C, washed thoroughly in PBS with 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich). The remaining binding sites in the wells were then saturated with a blocking buffer (PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% Tween 20) for 1 h at 37°C. Following washing, NHS (diluted 1 : 2) in veronal buffer pH 7.5 (100 µl) containing 0.5 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 0.05% Tween 20 and 0.1% gelatin was added to each well for complement activation for 60 min at 37°C. To stop further activation the microtitre plate was incubated on ice and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was immediately added to each well to a final concentration of 20 mM. Terminal complement complex (TCC) in fluid phase was measured by an ELISA based on reaction with mAb aE11 specific for a neoepitope exposed when C9 is incorporated in the complex, as described previously [11]. An aliquot of the supernatant fluid was pipetted off from each well for quantification based on comparison with a standard curve prepared by dilutions of Zymosan (Sigma-Aldrich) activated human serum defined to contain 1000 AU TCC/ml. The supernatant fluid was tested in different dilutions to ensure that the O.D. values fell on the steep part of the standard curve, the deduced TCC value being multiplied with the dilution to calculate the TCC value in each well transformed as AU/ml of undiluted NHS. To measure the amount of TCC deposited on the surface of the washed wells, mAb aE11 diluted 1 : 5000 was added to the wells. The bound antibody was detected with HRP conjugated sheep antimouse immunoglobulin (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) using 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline-sulphonate] (ABTS) (Sigma-Aldrich) as substrate. OD values were used to represent the relative amount of deposited TCC in the wells.

Assay of classical pathway activation by aggregated human IgG on solid phase

Soluble human aggregated IgG (HAIGG) was prepared by heating human IgG (Gammaglobulin Pharmacia & Upjohn, Stockholm, Sweden) 10 mg/ml in PBS pH 7.4 for 10 min at 63°C, immediately followed by cooling on ice. The protein was then stored in aliquots at 4°C. Activation of NHS 1 : 2 for 30 min at 37°C and assay for generation of TCC in fluid phase and deposition of TCC on solid phase were identical to the procedures for human IgM on solid phase described above.

Assay of classical pathway activation by aggregated human IgG in fluid phase

Serially diluted HAIGG (from 200 µg/ml) was added to 100 µl NHS 1 : 2 for complement activation for 30 min at 37°C. TCC was measured in fluid phase as for the solid phase IgM experiment described above.

Assay of classical pathway activation by aggregated human IgG in whole blood

Whole blood from a complement-sufficient healthy individual was collected using the thrombin-specific hirudin analogue lepirudin (Refludan, batch 18261611C, Hoechst, Frankfurt am Main, Germany, 50 µg/ml blood) as anticoagulant [12]. In contrast to heparin, lepirudin does not interfere with complement activation. The procedure for complement activation was identical to that for NHS. Plasma TCC levels were then measured.

Assay of other activation products

C3bc, C5a and C3bBbP complex were measured by ELISA as described by Garred *et al.* [13], Bergh *et al.* [14] and Mollnes *et al.* [12].

Haemolytic assay of classical pathway complement activation

Serially diluted NHS (from 1 : 2) in veronal buffer pH 7.2 containing 0.5 mM MgCl₂ and 0.2 mM CaCl₂ was mixed with sheep red blood cells (RBCs) sensitized with rabbit antisheep RBC antibody (Institut Virion\Serion GmbH, Würzburg, Germany) in a V-bottomed Sero-Wel96-well microtitre plate (Bibby Sterilin Ltd, Stone, Staffordshire, UK) for incubation at 37°C for 1 h. Then the microtitre plate was centrifuged at 300 × g and supernatant from each well was collected to a flat-bottomed 96-well Costar microtitre plate (Corning) for reading of OD at 405 nm. Percent haemolysis was calculated according to Fung *et al.* [8].

Haemolytic assay of alternative pathway complement activation

Serially diluted NHS (from 1 : 2) in veronal buffer pH 7.2 containing 7 mM EGTA and 3.5 mM MgCl₂ and 3 mg BSA/ml were mixed with washed unsensitized rabbit RBCs in a V-bottomed microtitre plate (Bibby Sterilin) for incubation at 37°C for 1 h followed by centrifugation and quantification of haemolysis as in the classical pathway assay.

Inhibition assays

mAbs were added to serum followed by incubation for 5 min at room temperature prior to activation and assay. Percentage remaining activity after inhibition was calculated as follows:

$$\left(\frac{\text{TCC after inhib. in HAIGG sample} - \text{TCC after inhib. in } T_{30} \text{ buffer control}}{\text{TCC without inhib. in HAIGG sample} - \text{TCC without inhib. in } T_{30} \text{ buffer control}} \right) \times 100$$

RESULTS

Inhibition of alternative pathway activation by antifactor D mAb 166-32

Factor D is a rate-limiting serine protease in the amplification loop of the alternative pathway [15]. Therefore it is a target of choice for effective inhibition of the alternative pathway. Antifactor D mAb 166-32 was generated by immunizing mice with

nan factor D and was shown to be effective in inhibiting complement activation [8,9]. Component C2 is specific for the classical and lectin pathways in the complement cascade. Anti-C2 mAb 166-32 was generated by immunizing mice with purified human C2 obtained by digesting human C2 with human C1s. The antibody binds both C2 and C2a (Fung *et al.* unpublished observations). To characterize the specificity of the antifactor D mAb 166-32 and anti-C2 mAb 175-62 used in this study, haemolytic assays were conducted using normal human serum (NHS), C2-depleted (C2D) and factor B-depleted (fBD) human sera.

Anti-factor D, anti-C2 or isotype-matched control mAbs were added to NHS at 100 µg/ml and the serum was serially diluted for haemolytic alternative pathway and classical pathway assays. The factor D mAb inhibited alternative pathway in NHS very effectively while the anti-C2 mAb had no effect on alternative pathway haemolytic activity (Fig. 1a). The antifactor D mAb had no effect on classical pathway haemolytic activity while the anti-C2 mAb inhibited classical pathway efficiently from serum dilution 1 : 8 (Fig. 1b). The marginal effect of anti-C2 in serum dilutions 1 : 2 and 1 : 4 is consistent with the high sensitivity of C2 to complement lysis by the classical pathway. Normal alternative pathway haemolytic activity was lost at serum dilution 1 : 6 while classical pathway haemolysis in NHS was lost at dilution 1 : 1024, consistent with the well-known difference in sensitivity of haemolysis in the two assay systems.

To further characterize the specificity of the antifactor D and anti-C2 mAbs, haemolytic assays were conducted with C2D and fBD human sera. First, the pathway specificity of the sera was tested. The C2D serum showed normal alternative pathway haemolytic activity but no classical pathway haemolytic activity (Fig. 1c). Conversely, the fBD serum had no alternative pathway haemolytic activity but normal classical pathway haemolytic activity (Fig. 1d). In inhibition experiments, the antifactor D, the anti-C2, or the isotype-matched control mAb at 100 µg/ml was added to the C2D and fBD sera which were then two fold serially diluted from 1 : 2 for haemolytic assays. The antifactor D mAb completely inhibited alternative pathway haemolytic activity in C2D serum while the anti-C2 mAb had no effect on the alternative pathway (Fig. 1e). The anti-C2 mAb completely inhibited classical pathway haemolytic activity in fBD serum while the antifactor D mAb had no effect on the classical pathway (Fig. 1f).

Alternative pathway haemolysis was used to determine the concentration of antifactor D mAb required to completely neutralize factor D in NHS at 1 : 2 dilution. Complete inhibition of haemolysis was achieved at 5 µg/ml of the antibody. Thus, 10 µg/ml was chosen to ensure complete inhibition of the alternative pathway in NHS at 1 : 2 dilution in the subsequent experiments by SAs. Based on similar experiments to ensure complete inhibition of the classical pathway, the anti-C2 mAb was used at 10 µg/ml serum.

Localization of the mAb 166-32 reactive epitope in the factor D molecule

As much as the antifactor D mAb 166-32 binds human factor D and not pig factor D, we used pig/human hybrid constructs of factor D to map the binding epitope of the antibody which is located in the 'methionine loop' of factor D (-CNRRTTHDGAITER) between Cys154 and Cys170. Arg156, His159 and Leu168 are critical for the antibody binding. This antibody binding site is distant from the catalytic site of the trypsin-like domain of factor D in which there is extensive homology with other serine

proteases of the complement system (C1r, C1s, MASP1, MASP2) (Fung *et al.* unpublished observations). This antibody binding site may be responsible for the interaction between factor D and factor B. Extensive search in the gene bank revealed no significant homology of this epitope sequence with other known proteins. This is consistent with the observations in the haemolytic assays that mAb 166-32 reacts specifically with factor D and inhibits the alternative pathway, but does not interfere with classical pathway components.

Inhibition of solid-phase classical pathway activation of normal human serum

Classical pathway activation was induced by purified human IgM adsorbed on the solid phase of microtitre plates in the presence of NHS at 1 : 2 dilution. Deposition of TCC, expressed as OD, increased with increasing amounts of immobilized IgM (Fig. 2a). Similar results were observed for TCC in fluid phase (Fig. 2b). TCC formation was abolished by the antifactor D mAb as indicated in both assays. Classical pathway activation was also induced with human aggregated IgG (HAIGG) on the solid phase. Similar results were obtained as with IgM. The amount of TCC on solid phase and in fluid phase was proportional to the amount of immobilized HAIGG. A reduction of 87% of TCC formation in the fluid phase by the antifactor D mAb was attained at 10 µg HAIGG/ml NHS.

Inhibition of fluid-phase classical pathway activation of normal human serum

Fluid phase classical pathway complement activation was induced by adding HAIGG directly into NHS. TCC formed in the fluid phase increased with increasing amounts of HAIGG. Inhibition by the antifactor D mAb was obtained with a reduction of 80% of TCC formation at 20 µg HAIGG/ml NHS and >80% at 10 µg HAIGG/ml NHS (Fig. 2c). Inhibition of HAIGG-induced activation in the fluid phase is illustrated in Fig. 3. To ensure optimal conditions for these inhibition experiments, an increased amount of HAIGG was used to induce stronger classical pathway activation in the control without any antibody added. In this control 200 µg HAIGG/ml NHS induced formation of 66.0 AU (arbitrary units) TCC/ml NHS (Fig. 3a). No inhibition was induced by the isotype-matched control mAb with 66.4 AU TCC/ml being generated. The anti-C2 mAb blocked activation with generation of only 1.2 AU TCC/ml NHS. Over 90% of TCC generation was inhibited by antifactor D with formation of 5.2 AU TCC/ml, while inhibition by a combination of the anti-C2 and antifactor D mAbs was even more profound, with a reduction in TCC to 0.8 AU/ml which is identical to the baseline level. Similar findings were obtained for the intermediary activation products C3bc and C5a (Fig. 3b,c).

The results of assay for the fluid phase alternative pathway convertase C3bBbP were of central importance for evaluating the effect of HAIGG on the alternative pathway. From a baseline value of 28 AU C3bBbP/ml NHS a marked increase to 954 AU/ml was observed after addition of 200 µg HAIGG/ml NHS (Fig. 3d). After addition of the anti-C2 mAb to block the classical pathway, formation of C3bBbP was markedly reduced to 108 AU/ml NHS. Anti-factor D reduced the C3bBbP value to 235 AU/ml NHS. The combination of the anti-C2 and antifactor D mAbs completely blocked C3bBbP formation giving a value similar to when the antifactor D mAb was added to serum without any HAIGG (21 and 26 AU/ml NHS, respectively), indicating that the antifactor D

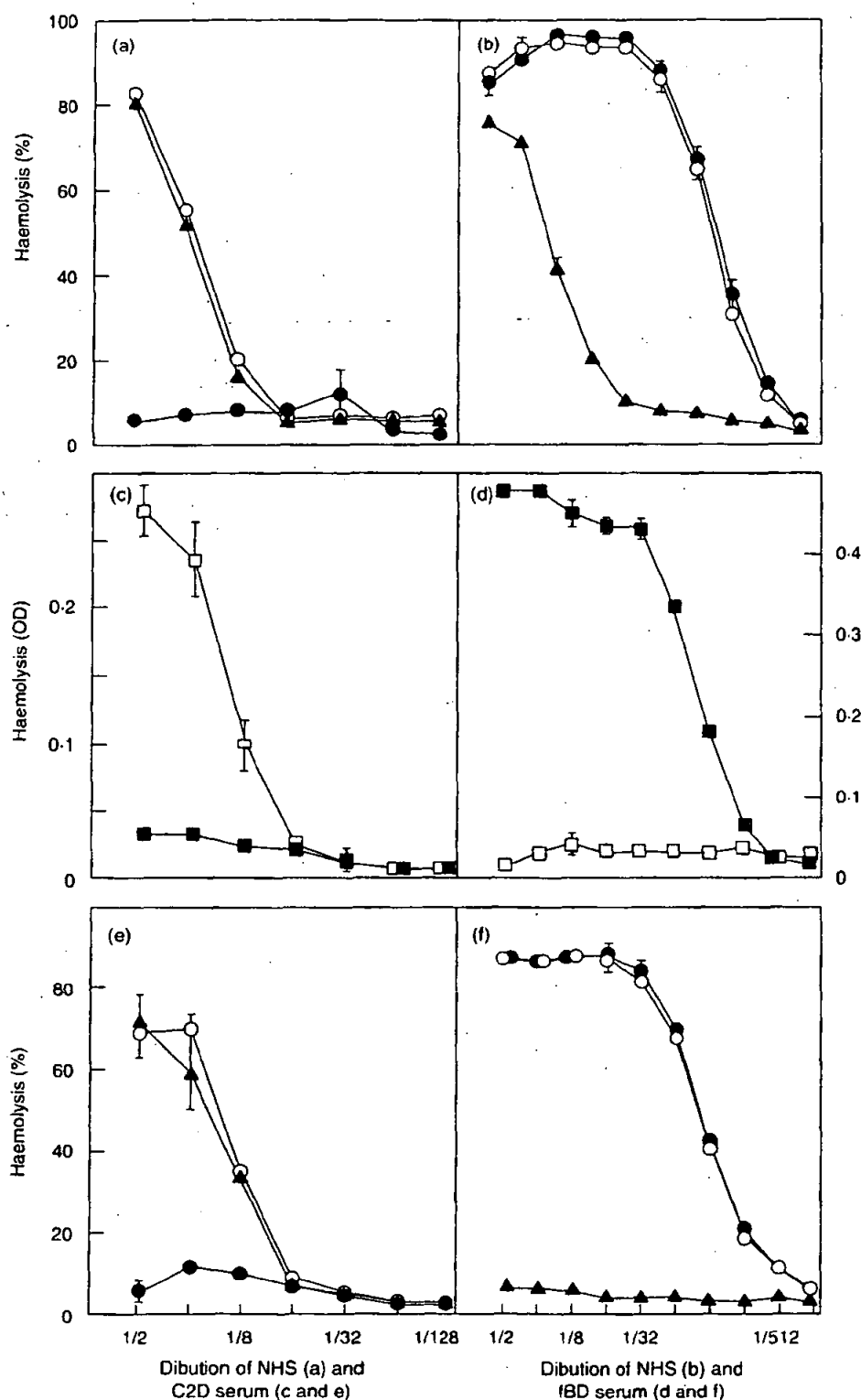
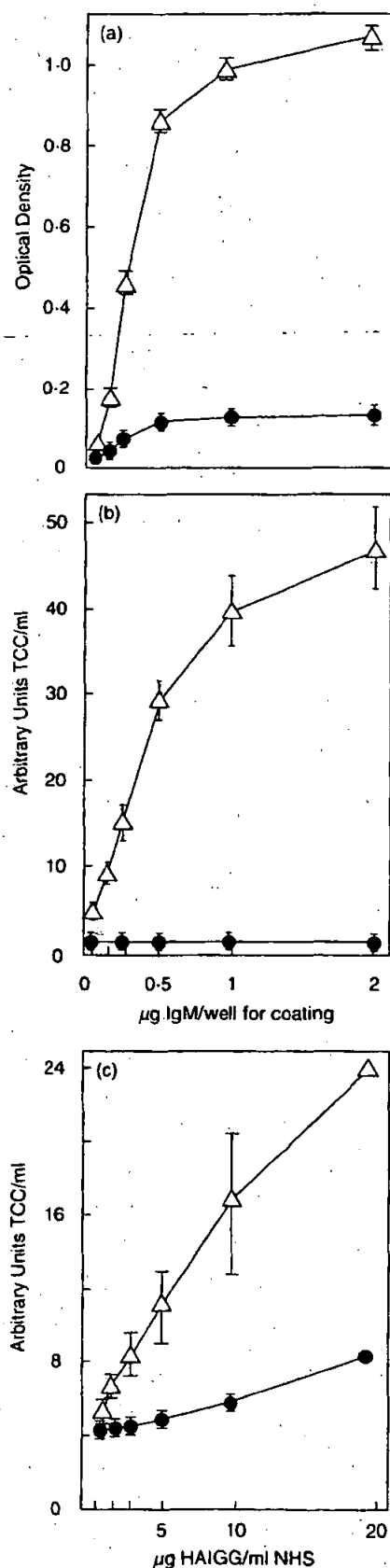


Fig. 1. Specificity of inhibition by antifactor D and anti-C2 mAbs in haemolytic assays. Anti-factor D mAb 166-32 (●) completely inhibited alternative pathway haemolytic activity in normal human serum (NHS) while anti-C2 mAb 175-62 (▲) and the control mAb (○) had no effect (a). Anti-factor D showed no inhibition of classical pathway haemolysis in NHS in contrast to anti-C2 (b). Normal alternative pathway haemolysis (□) and no classical pathway haemolysis (■) were found in C2-depleted (C2D) serum (c), while the opposite pattern was obtained in factor B depleted serum (d). Anti-factor D inhibited alternative pathway haemolysis in C2D serum completely while anti-C2 had no effect (e). The opposite pattern was obtained in factor B depleted serum (f).



mAb also blocks the spontaneous self-activation of the alternative pathway during the 30 min incubation at 37°C.

To confirm the general notion that HAIGG induces selective activation through the classical pathway in the present set-up and to exclude any direct alternative pathway activation by HAIGG, experiments were performed with C1q-depleted (C1qD) serum. Assay of the alternative pathway specific C3bBbP convertase is shown in Fig. 4. The baseline value in NHS was 28 AU/ml. The increased baseline value in C1qD serum (176 AU/ml) is consistent with *in vitro* complement activation during immunoadsorption when the C1qD serum was prepared. Addition of HAIGG to NHS induced activation and marked C3bBbP formation in a dose-response manner. By contrast, addition of 2 and 20 μg HAIGG/ml to C1qD serum induced no C3bBbP formation, showing that HAIGG had no direct effect on the alternative pathway. After reconstituting C1qD serum with 200 μg purified C1q/ml, C3bBbP was again generated in a dose-response manner with increasing amounts of HAIGG added, consistent with a restored classical pathway activity leading to alternative pathway amplification. The results of TCC assay corroborated with those on C3bBbP (data not shown).

Inhibition of fluid-phase classical pathway activation in whole blood

To study whether similar activation was obtained under more physiological conditions, experiments were repeated with whole blood from a complement-sufficient healthy individual in the model using the thrombin-specific hirudin analogue lepirudin as anticoagulant. In contrast to heparin, lepirudin does not interfere with complement activation (12). Addition of 100 μg HAIGG/ml blood induced a substantial TCC formation in plasma which was inhibited by the anti-C2 and antifactor D mAbs similar to what was found in the serum experiments (data not shown).

DISCUSSION

Interaction between the classical and alternative pathways may have different effects depending on the conditions. Antibodies may, e.g. mask cell-surface controls to facilitate C3b deposition and alternative pathway activation [16]. Furthermore during classical pathway activation, C4b deposition may recruit C3b directly forming a C2 independent classical pathway convertase [17]. Conversely, alternative pathway activation may increase the effect of initial classical pathway activation, consistent with the well-known amplification loop of the alternative pathway [18]. However, surprisingly few observations have been reported on the quantitative effect of the alternative pathway on classical pathway-induced activation [19]. Taking into account the important biological role of C5 activation, our data support a more crucial role for the alternative pathway in C5a and TCC formation than previously recognized. The main reason probably influencing the earlier observations is that classical pathway haemolytic assays

Fig. 2. Anti-factor D inhibition of classical pathway activation in NHS. Anti-factor D mAb 166-32 (●) abolished solid phase (a) and fluid phase (b) formation of TCC induced by human IgM on the solid phase (Δ; no antibody added). Similarly, antifactor D (●) profoundly inhibited fluid phase formation of TCC induced by human aggregated IgG (HAIGG) in the fluid phase (Δ; no antibody added) (c). The points and error bars indicate mean values and range from two independent experiments.

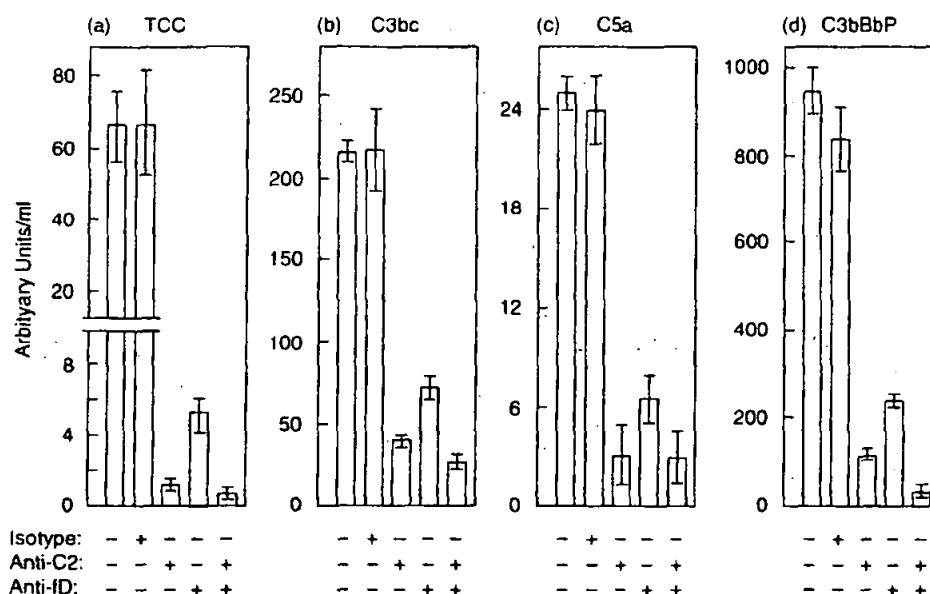


Fig. 3. Effect of antifactor D, anti-C2 and control antibody on HAIGG-induced activation in NHS. Anti-factor D mAb 166-32 inhibited more than 90% of fluid phase TCC formation induced by human HAIGG whereas anti-C2 and a combination of anti-C2 and antifactor D completely blocked TCC formation (a). The control antibody had no effect on TCC formation. Similar results were obtained for the activation products C3bc (b), C5a (c) and C3bBbP (d). The data and error bars as for Fig. 2.

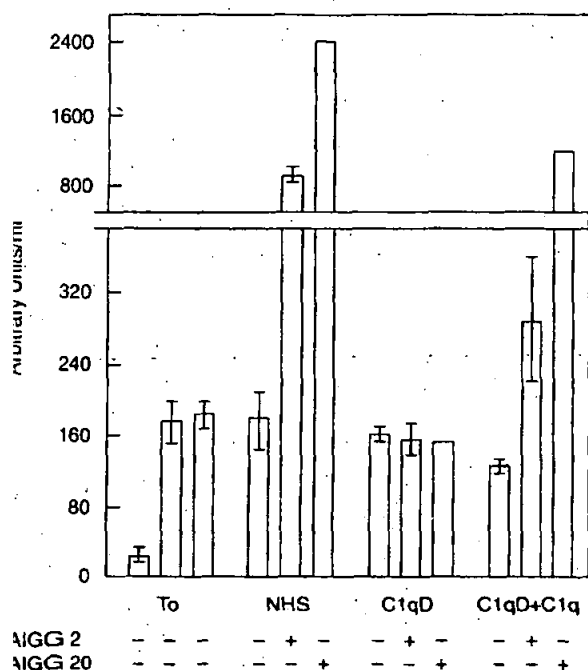
were unsuitable to demonstrate the involvement of alternative pathway amplification when carried out at serum dilutions with undetectable alternative pathway activity ($>1:16$, Fig. 1a,c,e). We used high serum concentration (dilution 1:2 in the final reaction mixture) to approach physiological conditions and to ensure a fully active alternative pathway. In addition, a substantial amount of the earlier work used complement-depleted serum with a potential loss of bystander complement components during immunoadsorption. The reported effects of alternative pathway amplification on the effect of classical pathway induced activation vary with different methods, and the results are mostly qualitative or semiquantitative.

Our observations on the influence of alternative pathway amplification on the effect of initial classical pathway complement activation can be explained based on the known mechanisms of C3 and C5 convertase formation. The classical pathway C3 convertase C4b2a splits C3 into C3a and C3b resulting in formation of the classical pathway C5 convertase C4b2a3b which splits C5 into C5a and C5b. C5a induces reactions with potent pathophysiologic effects [20], and formation of C5b is the first step in assembly of the later components into the inflammatory and lytic TCC. In the alternative pathway low amounts of spontaneously formed C3(H₂O) binds factor B which is cleaved into Ba and Bb by factor D. C3(H₂O)Bb splits more C3, resulting in self-amplification with formation of the alternative pathway C5 convertase C3bBb3b. Incorporation of additional C3b molecules in this complex results in markedly increased C5 convertase activity [21]. C3b initially formed from C3 cleavage by the classical pathway C3 convertase augments the formation of alternative pathway C5 convertase. Thereby C3b deposition becomes independent of the initial trigger by the classical and lectin pathways and is a main component of the alternative pathway convertase. Studies on the formation of classical pathway C5 convertase on antibody-coated sheep RBCs

indicate that one in every four C4b molecule is bound with a catalytic C2a molecule [22]. On the other hand, every molecule of C3b deposited on unsensitized rabbit RBCs binds a catalytic Bb molecule [21]. Therefore every molecule of C3b has the potential to form an alternative pathway C5 convertase complex. In general, fewer classical pathway C5 convertase sites are generated than alternative pathway C5 convertase sites once the complement system is activated, explaining the amplification of the classical pathway by the alternative pathway.

The complement system is strictly regulated both at the surface and in the fluid phase [23]. C3b is rapidly inactivated to iC3b by factors I and H in the fluid phase. Since C5 binds only to C3b and not to iC3b, the classical pathway C5 convertase tends to generate only small amounts of TCC when regulation is kept under control. Extensive consumption of the terminal components with formation of substantial amounts of TCC requires C3b to be bound on a 'protected surface', facilitating factor B instead of factor H binding to C3b, thereby generating an alternative pathway C5 convertase. Evidence for this effect was provided by Reiter and Fishelson [24] showing that when C3b is coupled to IgG it becomes highly resistant to inactivation by Factors I and H, i.e. that IgG provides a protected surface.

The physiological benefit of alternative pathway amplification is particularly important when the classical and lectin pathways are not functioning at their full capacity. For example in newborns, maternal IgG decreases while their immune system is still not fully developed. A broad array of antibodies in limited amounts may still be essential in defense against bacterial infection when assisted by local alternative pathway amplification. On the other hand, alternative pathway activation can cause serious inflammation and tissue damage in various clinical conditions if complement is inappropriately activated or if activation occurs systemically with breakdown of the control mechanisms. These



4. Fluid phase C3bBbP formation after HAIGG-induced activation. HS, C1q depleted serum (C1qD) and C1qD reconstituted with purified C1q. Addition of HAIGG to NHS induced activation and marked C3bBbP formation in a dose-response manner. By contrast, addition of HAIGG to C1qD serum induced no C3bBbP formation, showing that HAIGG had direct effect on the alternative pathway. After reconstituting C1qD with purified C1q, C3bBbP was again generated in a dose-response manner with increasing amounts of HAIGG, consistent with a restored classical pathway activity leading to alternative pathway amplification. Baseline value in NHS (left), C1qD (middle) and C1qD + C1q (right). Data and error bars as for Fig. 2.

al roles' of the complement system represent a double-edged sword of innate immunity.

Therapeutic intervention of the complement system is currently of great interest. The key issue is to select optimal steps or ways for safe and effective inhibition. Our findings indicate a dual role of factor D in the activation of the complement cascade since antifactor D mAb 166-32 in addition to inhibiting the alternative pathway *per se*, inhibited >80% of classical pathway activated C5a and TCC formation. The therapeutic benefits of targeting the alternative pathway should be validated in experimental models of various human diseases, including I/R injury, immune-complex diseases and sepsis. HAIGG was used in our study as a prototype model similar to previous studies of immune complex deposition [25] and lupus nephritis [26]. MRL/lpr mice develop a spontaneous lupus-like disease characterized by immune complex glomerulonephritis. Decreased tissue damage has been demonstrated in factor B-deficient [27] as well as in D-deficient [28] MRL/lpr mice. In a mouse model of arthritis triggered by immune complex deposition, manifestation of renal disease was shown to be dependent of alternative pathway activation [29]. In the antiphospholipid syndrome [APS] phospholipid autoantibodies react with lipid-binding proteins on endothelial cells to trigger complement activation which causes cell damage, a procoagulant state, thrombosis, and fetal

death secondary to placental insufficiency [30]. In an experimental model of APS it was recently shown that both the classical and alternative pathways are required to generate sufficient C5 cleavage to cause fetal loss [31]. In all these *in vivo* models the striking common feature is an increased effect of initial classical pathway activation induced by the alternative pathway.

Terminal complement activation is closely associated with the development of experimental lethal sepsis [20]. Excessive alternative pathway activation has also been documented in patients with *Neisseria* infection with poor outcome [32]. It seems appropriate to suggest that uncontrolled alternative pathway activation during sepsis is a main cause of the homeostatic breakdown and lethal outcome in the most severe form of the disease. Our combined data indicate that uncontrolled alternative pathway activation is responsible for systemic 'explosive' complement activation. Therefore, selective inhibition of the alternative pathway with preserved function of the initial classical and lectin pathway activation could attenuate severe inflammation and tissue injury and be an attractive therapeutic approach for these clinical indications.

Together, our studies provide for the first time quantitative evidence to explain the previous observations and highlight the predominant role of the alternative pathway in amplification of effector functions in the complement system.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Grethe Bergseth and Dorte Christiansen for performing complement activation assays, Kåre Bergh for providing the antibodies for the C5a assay, Matthew Moyle for useful discussion of experiments, and John P. Atkinson for critical reading and valuable suggestions to the manuscript.

Financial supports were kindly provided to T. E. Mollnes by Tanox Inc., Research Council of Rikshospitalet, Norwegian Council on Cardiovascular Disease, Norwegian Foundation for Health and Rehabilitation, Sonneborn Chairtable Trust, Odd Fellow Foundation, Norsk Revmatikerforbund and Gythfeldt's legacy.

REFERENCES

- Walport JM. Advances in immunology: Complement – first of two parts. *New Engl J Med* 2001; **344**:1058–66.
- Mollnes TE, Song W-C, Lambris JD. Complement in inflammatory tissue damage and disease. *Trends Immunol* 2002; **23**:61–4.
- Hill JH, Ward PA. The phlogistic role of C3 leukotactic fragments in myocardial infarcts of rats. *J Exp Med* 1971; **133**:885–900.
- Weisman HF, Bartow T, Leppo MK *et al*. Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science* 1990; **249**:146–51.
- Chan RK, Ibrahim SI, Verna N, Carroll M, Moore FD Jr, Hechtman HB. Ischaemia-reperfusion is an event triggered by immune complexes and complement. *Br J Surg* 2003; **90**:1470–8.
- Zhang M, Austen WG Jr, Chiu I *et al*. Identification of a specific self-reactive IgM antibody that initiates intestinal ischemia/reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**:3886–91.
- Stahl GL, Xu Y, Hao L, Miller M, Buras JA, Fung M, Zhao H. Role for the alternative complement pathway in ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol* 2003; **162**:449–55.
- Fung M, Loubser PG, Ündar A, Mueller M, Sun C, Sun WN, Vaughn WK, Fraser CD Jr. Inhibition of complement, neutrophil, and platelet activation by an anti-factor D monoclonal antibody in simulated cardiopulmonary bypass circuits. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; **122**:113–22.
- Ündar A, Eichstaedt HC, Clubb FJ Jr, Fung M, Lu M, Bigley JE, Vaughn WK, Fraser CD Jr. Novel anti-factor D monoclonal antibody

- inhibits complement and leukocyte activation in a baboon model of cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2002; **74**:355–62.
- 10 Roos A, Bouwman LH, Munoz J *et al*. Functional characterization of the lectin pathway of complement in human serum. *Mol Immunol* 2003; **39**:655–68.
 - 11 Mollnes TE, Lea T, Frøland SS, Harboe M. Quantification of the terminal complement complex in human plasma by an enzyme-linked immunosorbent assay based on monoclonal antibodies against a neoepitope of the complex. *Scand J Immunol* 1985; **22**:197–202.
 - 12 Mollnes TE, Brekke O-L, Fung M *et al*. Essential role of the C5a receptor in *E. coli*-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation. *Blood* 2002; **100**:1869–77.
 - 13 Garred P, Mollnes TE, Lea T. Quantification in enzyme-linked immunosorbent assay of a C3 neoepitope expressed on activated human complement factor C3. *Scand J Immunol* 1998; **27**:329–35.
 - 14 Bergh K, Iversen OJ. Production of monoclonal antibodies against the human anaphylatoxin C5a des Arg and their application in the neoepitope-specific sandwich-ELISA for the quantification of C5a des Arg in plasma. *J Immunol Meth* 1992; **152**:79–87.
 - 15 Volanakis JE, Narayana SVL. Complement factor D, a novel serine protease. *Protein Sci* 1996; **5**:553–64.
 - 16 Rainoff WD, Fearon DT, Austen KF. The role of antibody in the activation of the alternative complement pathway. *Springer Semin Immunopath* 1983; **6**:361–71.
 - 17 Farries TC, Steuer KL, Atkinson JP. The mechanism of activation of the alternative pathway of complement by cell-bound C4b. *Mol Immunol* 1990; **27**:1155–61.
 - 18 Fearon DT, Austen KF. Current concepts in immunology: the alternative pathway of complement – a system for host resistance to microbial infection. *New Engl J Med* 1980; **303**:259–63.
 - 19 Gupta-Bansal R, Parent JB, Brunden KR. Inhibition of complement alternative pathway function with anti-properdin monoclonal antibodies. *Mol Immunol* 2000; **37**:191–201.
 - 20 Ward PA. The dark side of C5a in sepsis. *Nature Rev Immunol* 2004; **4**:133–42.
 - 21 Rawal N, Pangburn MK. Formation of high-affinity C5 convertases of the alternative pathway of complement. *J Immunol* 2001; **166**:2635–42.
 - 22 Rawal N, Pangburn MK. Formation of high affinity C5 convertase of the classical pathway of complement. *J Biol Chem* 2003; **278**:38476–83.
 - 23 Mollnes TE, Lachmann PJ. Regulation of complement. *Scand J Immunol* 1988; **27**:127–42.
 - 24 Reiter Y, Fishelson Z. Targeting of complement to tumor cells by heteroconjugates composed of antibodies and of the complement component C3b. *J Immunol* 1989; **142**:2771–7.
 - 25 Rostagno AA, Gallo G, Gold LI. Binding of polymeric IgG to fibronectin in extracellular matrices: an in vitro paradigm for immune-complex deposition. *Mol Immunol* 2002; **38**:1101–11.
 - 26 Kaneko N, Masuyama J, Nara H, Hirata D, Iwamoto M, Okazaki H, Minota S, Yoshio T. Production of thromboxane A₂ and prostaglandin I₂ affected by interaction of heat aggregated IgG, endothelial cells, and platelets in lupus nephritis. *J Rheumatol* 2002; **29**:2106–13.
 - 27 Watanabe H, Garnier G, Circolo A *et al*. Modulation of renal disease in MRL/lpr mice genetically deficient in the alternative complement pathway factor B. *J Immunol* 2000; **164**:786–94.
 - 28 Elliott MK, Jarmi T, Ruiz P, Xu Y, Holers VM, Gilkeson GS. Effects of complement factor D deficiency on the renal disease of MRL/lpr mice. *Kidney Int* 2004; **65**:129–38.
 - 29 Ji H, Ohmura K, Mahmood U *et al*. Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity* 2002; **16**:157–68.
 - 30 Atkinson JP. Complement system on the attack in autoimmunity. *J Clin Invest* 2003; **112**:1639–41.
 - 31 Girardi G, Berman J, Redecha P *et al*. Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest* 2003; **112**:1644–54.
 - 32 Brandtzaeg P, Høgåsen K, Kierulf P, Mollnes TE. The excessive complement activation in fulminant meningococcal septicemia is predominantly caused by alternative pathway activation. *J Infect Dis* 1996; **173**:647–55.

AS: 99708
115

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

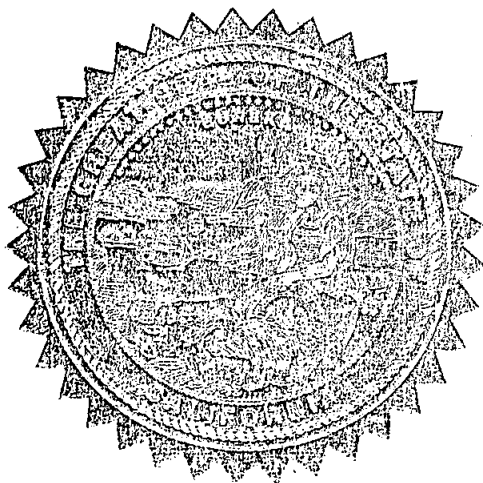
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

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

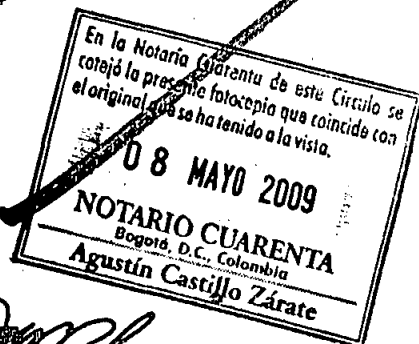
CERTIFIED

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



[Handwritten signature]



[Handwritten signature]

Secretary of State

[Handwritten signature]

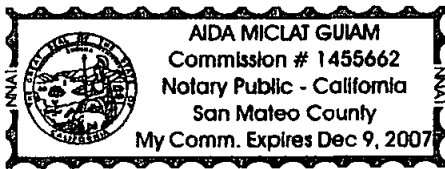


CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

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

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

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



WITNESS my hand and official seal.
Aida 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.

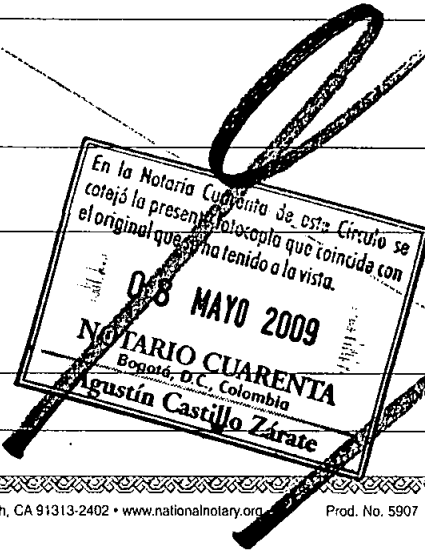
Description of Attached Document

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

BOGOTA - COLOMBIA

115

PODER

nosotros)

iliado(s) en

ro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO**
EATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO
MAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA, de Bogotá,
bia, apoderados verdaderos y legales con poder
ial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y
dades colombianas administrativas, judiciales y de
l, en cualquier instancia o recurso, la obtención de
es de invención, registros de marcas, diseños
riales, modelos de utilidad, depósitos de nombres
ciales y enseñas, registros de derechos de autor y
tos sobre los mismos, obtención de certificados de
or de variedades vegetales, así como sus prórrogas,
aciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre
omicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de
a y licencias de cualesquiera clases; intervenir como
dante o como demandado en cualquier instancia y
o ante cualquier juez, corporación, funcionario público
oridad en acciones judiciales, administrativas y de
l tales como: oposiciones al registro de marcas;
ies de caducidad, cancelación y nulidad; acciones
licatorias, acciones derivadas de la obtención o
ación de licencias; acciones de competencia desleal;
rdas penales; acciones de indemnización de
sios, reclamos y observaciones a solicitudes de
es, diseños industriales, modelos de utilidad, en el
sio de medidas cautelares y en otras acciones o
las similares.

e efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes,
lar descripciones, enmiendas, protestas,
aciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades,
ciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y
menes prescritos por la ley; renunciar o desistir a
hos concedidos o en curso de concesión; recibir toda
de documentos y valores, dando el descargo
ctivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades
los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas
edidas que creyeren conducentes al resguardo de mis
tros intereses), con todas las demás facultades legales
arias.

poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en
nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de
ir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o
rte y revocar sustituciones. Asimismo nombramos
JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ
JAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o
ECTOR GOMEZ MEJIA, domiciliado(s) en la Carrera 7
6-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia,
facultades para recibir notificaciones, designar
erados judiciales o extrajudiciales.

ado y firmado en

de

de

ore

o

POWER OF ATTORNEY

I (We)

Genentech, Inc.

1 DNA Way

domiciled in

South San Francisco, California 94080-4990
USA

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

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

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

and signed in

South San Francisco, California
USA

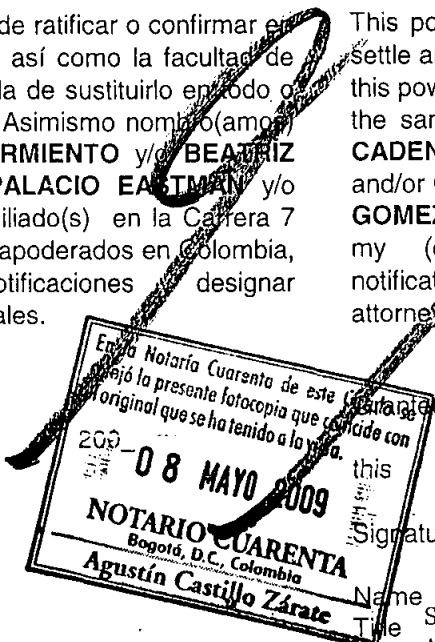
6th

day

of December 2005

Signature

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



AUTHORIZATION

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

August 27, 2002

Dated

Sean Johnston

Sean A. Johnston

Vice President, Intellectual Property
Genentech, Inc.



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

ESTADO DE CALIFORNIA
SECRETARIA DE ESTADO

APOSTILLA

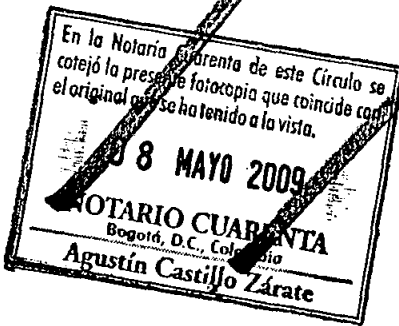
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

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

CERTIFICADO

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

10. Firma
(Firma)
Secretario de Estado



RECONOCIMIENTO TODO-PROPOSITO DE CALIFORNIA

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

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

☐ a quien conozco personalmente

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

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

Atestigua mi firma y sello oficial.

AIDA MICLAT GUIAM

OPCIONAL

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

Descripción adicional de cualquier documento anexo

Título o tipo de documento: _____

Fecha del Documento: _____ Número de páginas: _____

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

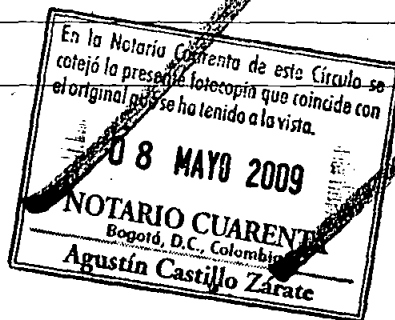
Capacidad(es) Reivindicada(s) por el (los) firmante(s)

Nombre del firmante: _____

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

El firmante representa: _____

Huella Índice
derecho del firmante
Parte alta del dedo aquí



AUTORIZACION

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

27 de Agosto de 2002
Fechado

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



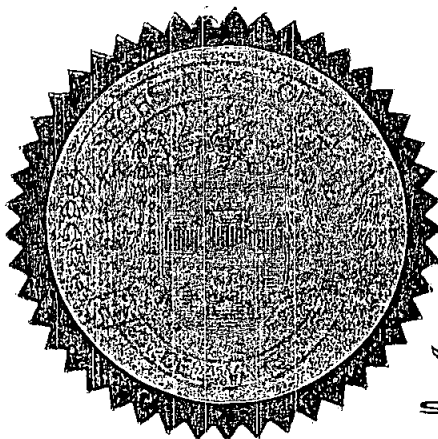
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

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

Certified

5. at Dover, Delaware
6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005
7. by Secretary of State, Delaware Department of State
8. No. 0254030
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State

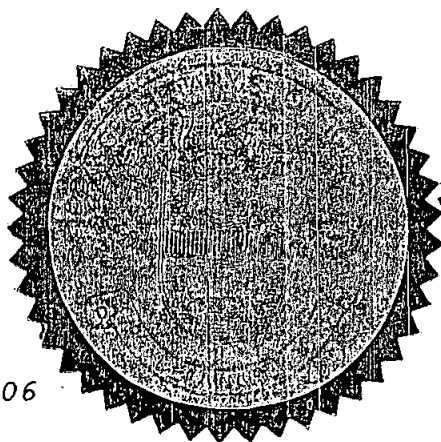


Delaware

PAGE 1

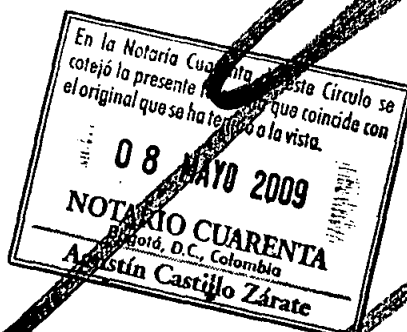
The First State

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



2112549

050426506



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900384

DATE: 05-24-05

AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

GENENTECH, INC.

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

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

ARTICLE 1

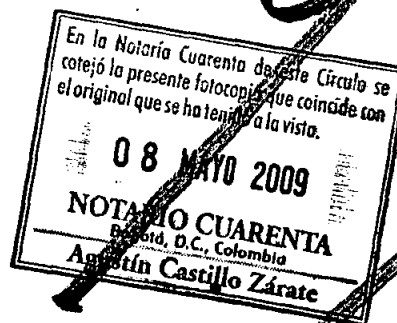
The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

ARTICLE 2

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

ARTICLE 3

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



STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 09:00 AM 07/22/1999
991302331 - 2112549

ARTICLE 4

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

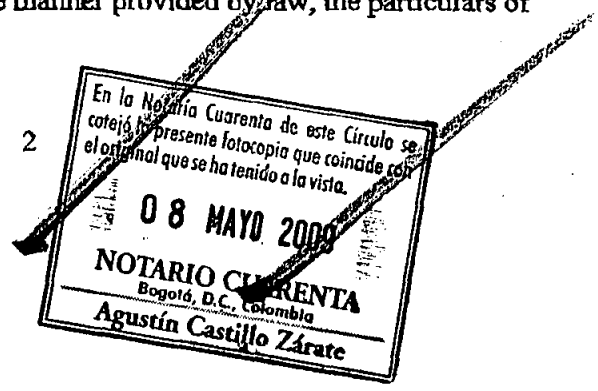
(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the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

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

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

SECTION 4.03. *Preferred Stock.*

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



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

(i) the distinctive designation of such series and the number of shares which shall constitute such series, which number may be increased (except where otherwise provided by the Board of Directors in creating such series) or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) from time to time by like action of the Board of Directors;

(ii) the annual rate of dividends payable on shares of such series, the conditions upon which such dividends shall be payable and the date from which dividends shall be cumulative in the event the Board of Directors determines that dividends shall be cumulative;

(iii) whether such series shall have voting rights, in addition to the voting rights provided by law and, if so, the terms of such voting rights;

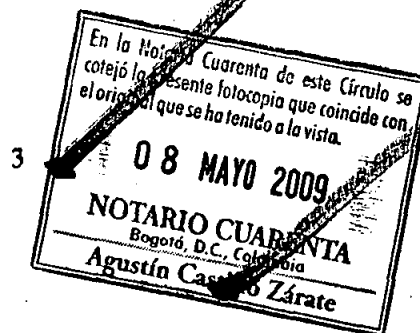
(iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;

(v) whether or not the shares of such series shall be redeemable and, if so, the terms and conditions of such redemption, including the date or dates upon or after which they shall be redeemable, and the amount per share payable in case of redemption, which amount may vary under different conditions and at different redemption dates;

(vi) whether such series shall have a sinking fund for the redemption or purchase of shares of that series and, if so, the terms and amount of such sinking fund;

(vii) the rights of the shares of such series in the event of voluntary or involuntary liquidation, dissolution or winding up of the Corporation, and the relative rights of priority, if any, of payment of shares of that series; and

(viii) any other relative rights, preferences and limitations of such series.



125

ARTICLE 5

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

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

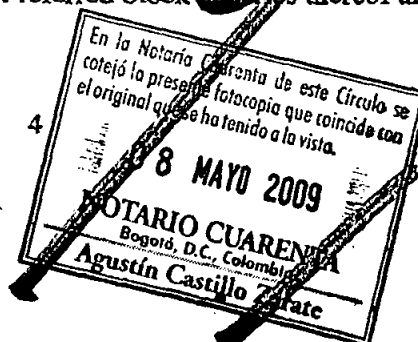
(c) Sections 3.03(c) and 3.15 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

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

ARTICLE 6

SECTION 6.01. *Election of Directors by Holders of Preferred Stock.*

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



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

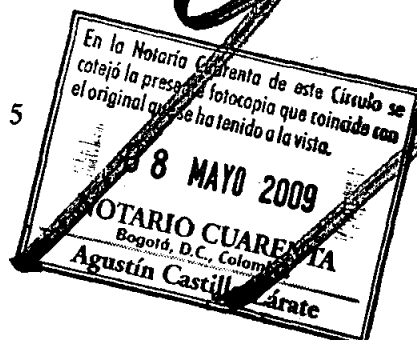
SECTION 6.02. *Ballots.* Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

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

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

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

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



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

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

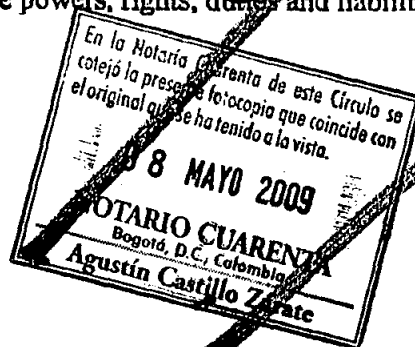
(f) Neither the alteration, amendment, repeal or rescission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect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

ARTICLE 7

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

ARTICLE 8

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



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

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

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

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

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

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

7

En la Notaría Cuarenta de este Circuito se
colegió la presente fotocopia que coincide con
el original que se ha tenido a la vista.

08 MAYO 2009

NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zúñiga

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.

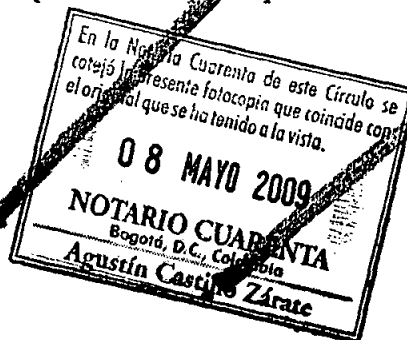
SECTION 8.06. *Termination: Binding Effect.* Notwithstanding anything in this Certificate of Incorporation to the contrary, the foregoing provisions of this Article 8 shall expire on the date that Roche ceases to own beneficially Common Stock representing at least 5% of the number of outstanding shares 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

8



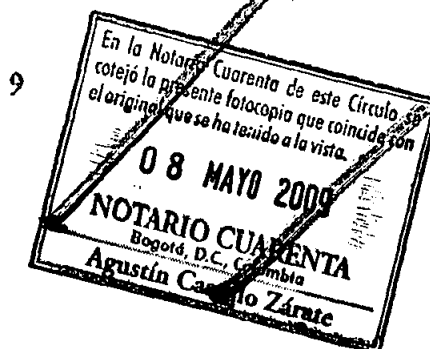
meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment,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

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

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

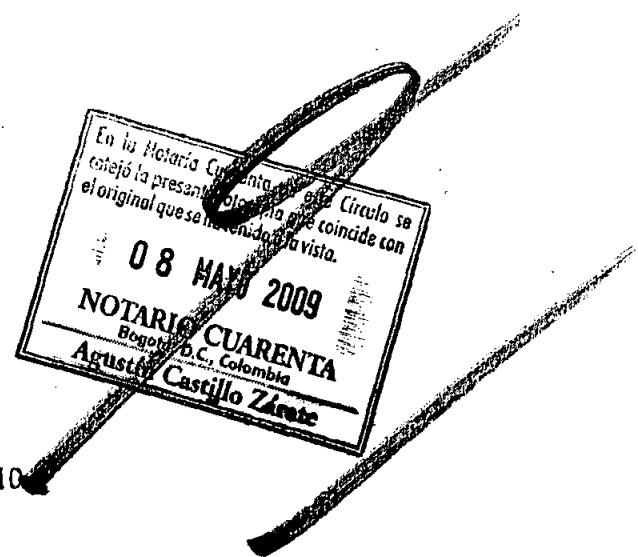
SECTION 9.04. *Deemed Consent by Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 9.

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



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

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



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

GENENTECH, INC.

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



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

APOSTILLA

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

País: Estados Unidos de América

Este documento público

ha sido firmado por Harriet Smith Windsor

actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware

lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

en Dover, Delaware

el veinticuatro de mayo, A. D. 2005

por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware

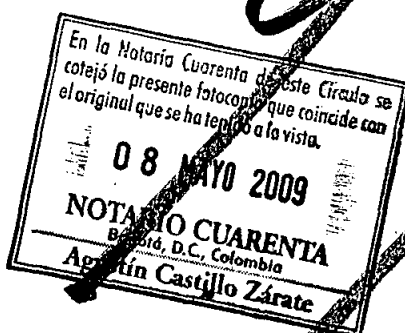
No. 0254030

Sello/timbre

10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)

Secretaria de Estado



DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

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



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

FECHA: 05 - 24 - 05

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

Genentech, Inc (la "**Corporación**"), una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, por la presente corrige el Certificado de Incorporación, el fue presentado originalmente el 13 de diciembre de 1986, bajo el nombre "Genentech Delaware, Inc.", y corregido subsiguientemente.

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

ARTICULO 1

El nombre de la Corporación es: Genentech, Inc.

ARTICULO 2

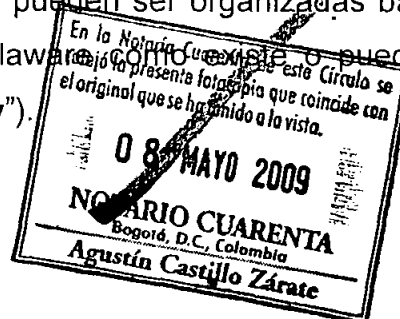
La dirección de la oficina registrada de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, Ciudad de Wilmington, Condado de New castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

ARTICULO 3

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

ARTICULO 4

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



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

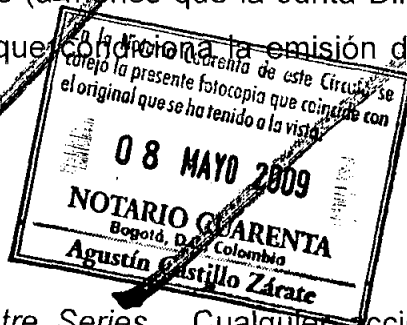
(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de
cciones puede incrementarse o disminuirse (pero no por debajo del número del
úmero de acciones de las mismas que en su momento están vigentes) por el voto
firmativo de una mayoría con poder de votación de las acciones vigentes de la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

SECCION 4.02. *Acción Común.* (a) *Emisión y Consideración.* Cualquier
cción sin emitir o del tesoro del las Acciones Comunes puede emitirse para tal
onsideración como pueda fijarse de acuerdo con la ley aplicable cada cierto
empo 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
ecibir, 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
endrán derecho a participar en tales dividendos (salvo que la Junta Directiva
etermine lo contrario en cualquier resolución que ~~condiciona la emisión de una~~
serie de Acciones Preferenciales).

SECCIÓN 4.03. *Acción Preferencial*

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



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

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

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

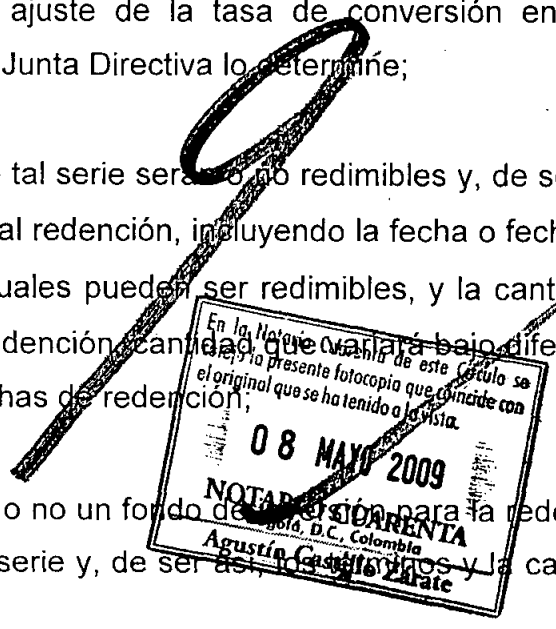
(iii) si la serie tendrá o no derechos de voto, además de los derechos de voto provistos por la ley, y de ser así, los términos de tales derechos de voto;

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

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

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

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



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

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

ARTICULO 5

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

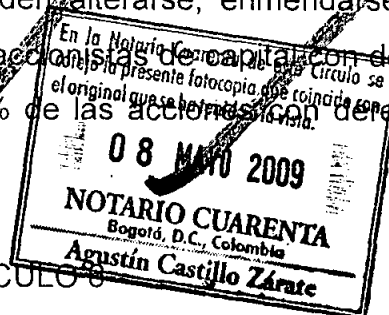
(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.04, 3.05, 3.14 y 5.06 de los estatutos solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 60% de las acciones con derecho a votar las mismas.

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

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

ARTICULO 6

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



cción 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 voto escrito 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 Valores.

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



ermita 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 y 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.

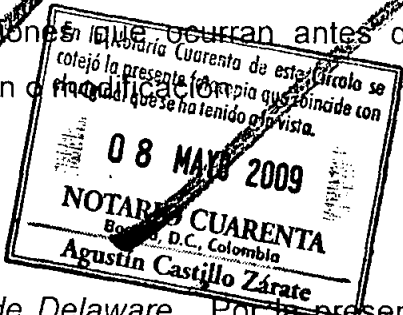
(c) La Corporación puede, por acción de su Junta Directiva, proporcionar indemnización a tales funcionarios, empleados y agentes de la Corporación hasta el punto y a tal efecto como lo determine apropiado la Junta Directiva y lo autorice la Ley de Delaware.

(d) La Corporación tendrá el poder de comprar y mantener un seguro a favor 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 surja de su estado como tal, ya sea si la Corporación tiene o no el poder de indemnizarlo contra tal responsabilidad bajo la ley de Delaware.

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

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

ARTICULO 7



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

ARTICULO 8

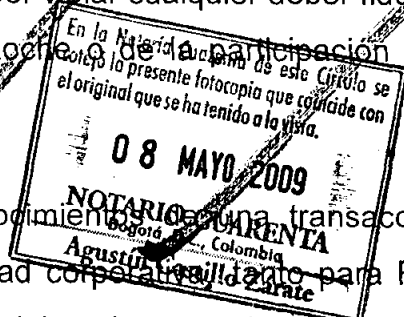
SECCION 8.01. *Relación con Roche.* Anticipándose a que la Corporación sea de ser un subsidiaria completamente de propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se define en la sección 8.05) permanezca siendo un accionista de la Corporación, y anticipándose a que la Corporación (como se define 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 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 adquiera conocimiento de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa para Roche como para la Corporación, Roche no tendrá el deber de comunicar u ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación y no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario como accionista de la Corporación o la persona que controla a un accionista por razón del hecho

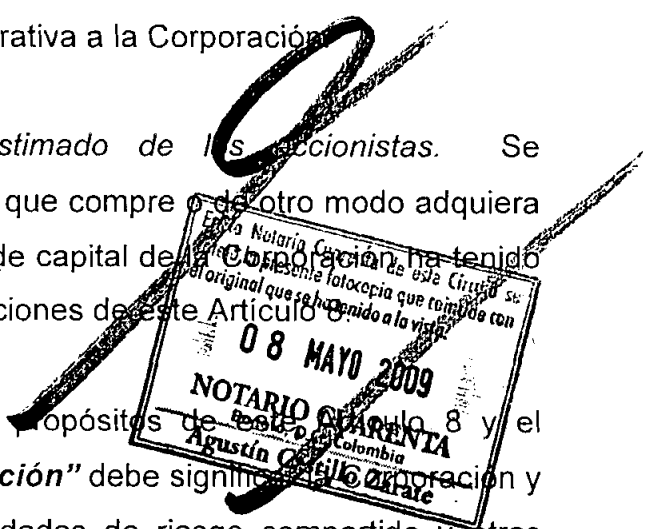


ue Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma, dirige
il oportunidad corporativa a otra persona o entidad, o no comunica información
aspecto, u ofrece, tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.03. *Oportunidades Corporativas.* En el evento que un director,
ncionario o empleado de la Corporación quien también es director, funcionario o
mpleado de Roche adquiera conocimiento de una transacción o materia potencial
ue pueda ser una oportunidad corporativa para la Corporación y Roche (ya se si
sta transacción o materia potencial es propuesta por un tercero o es concebida
or tal director, funcionario o empleado de la Corporación o no), tal director,
ncionario o empleado debe tener el derecho a ofrecer tal oportunidad corporativa
la Corporación o Roche como tal director, funcionario o empleado los considere
propiado bajo las circunstancias de su discreción, y tal director, funcionario o
mpleado no será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar
ingún deber fiduciario o deber de lealtad o faltar en actuar en (o no oponerse a)
os mejores intereses de la Corporación o la derivación de ningún beneficio
ersonal inapropiado por razón del hecho que (i) tal director, funcionario o
mpleado ofreció tal oportunidad corporativa a Roche (en lugar de a la
Corporación) o no comunicó información respecto a tal oportunidad corporativa a
a Corporación o (ii) Roche busca o adquiere tal oportunidad corporativa para si
nisma o dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o no comunica
nformación 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
oticia 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
odas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido y otras
entidades en las cuales la Corporación posee con beneficio (directa o
ndirectamente) cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poder de
voto o intereses de voto similares, y (ii) el término **"Roche"** debe significar Roche
Holdings, Inc y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo
compartido, asociaciones y otras entidades (diferentes a la Corporación, definida
de acuerdo con la cláusula (i) de esta sección 8.05) que son **"afiliados"** (como se



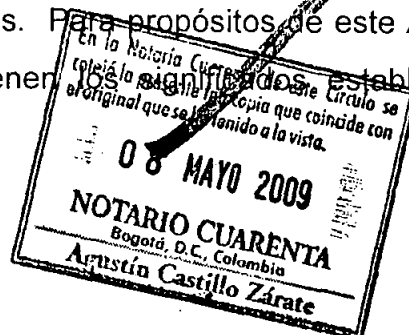
efine en la Regla 12b-2 bajo el Acta de Intercambio de Valores de 1934, como se enmendó) de Roche Holdings, Inc.

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

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

ARTICULO 9

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

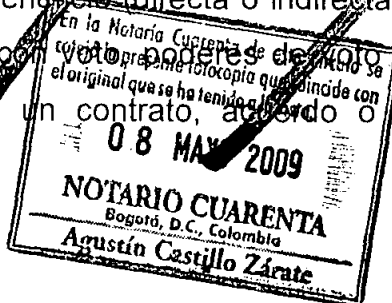


SECCION 9.02. *Quórum.* Los Directores de la Corporación que son también directores o funcionarios de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de la Junta Directiva o de un comité que autoriza o aprueba cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o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

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

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

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



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

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

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

GENENTECH, INC.

Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente

Consejo General y Secretaría



Apostille

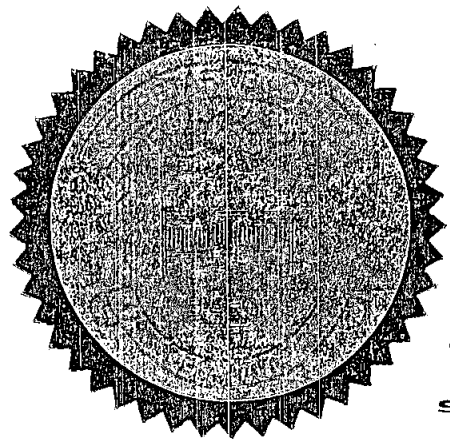
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

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

Certified

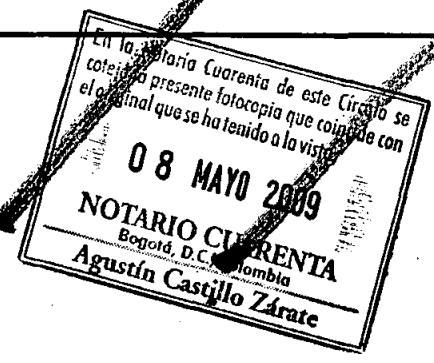
- 5. at Dover, Delaware
- 5. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005
- 7. by Secretary of State, Delaware Department of State
- 3. No. 0254031

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State

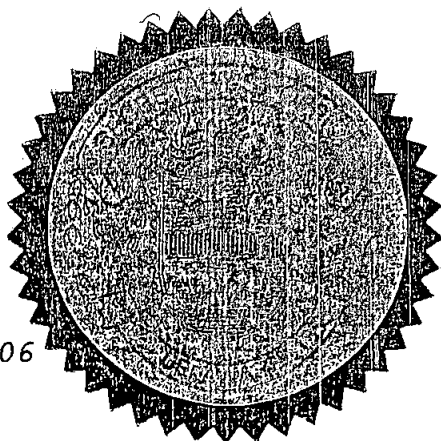


Delaware

PAGE 1

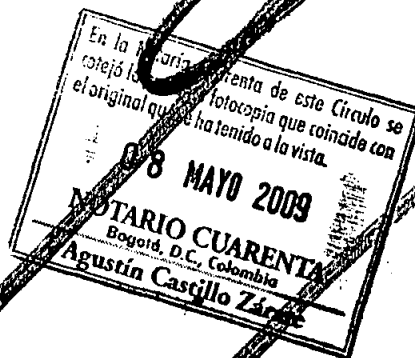
The First State

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



2112549

050426506



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900385

DATE: 05-24-05

148

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 42 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

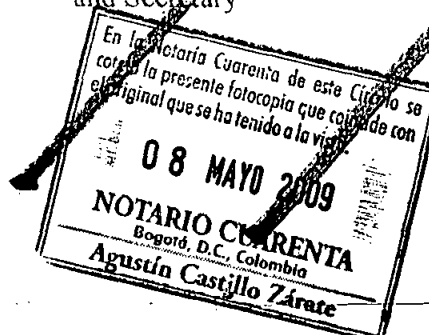
FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

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

GENENTECH, INC.

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

841



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

APOSTILLA

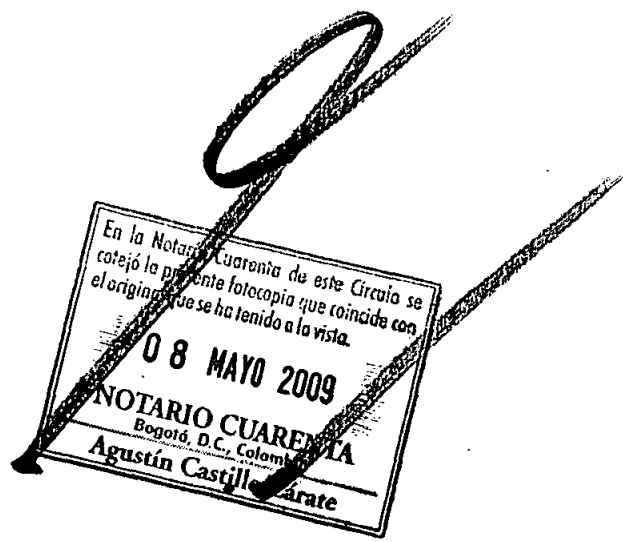
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

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

Certificado

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

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



150

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL
STADO 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
VECIMOQUINTO 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

15

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

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

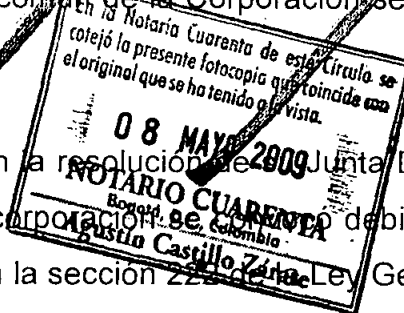
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

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

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

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

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



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

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

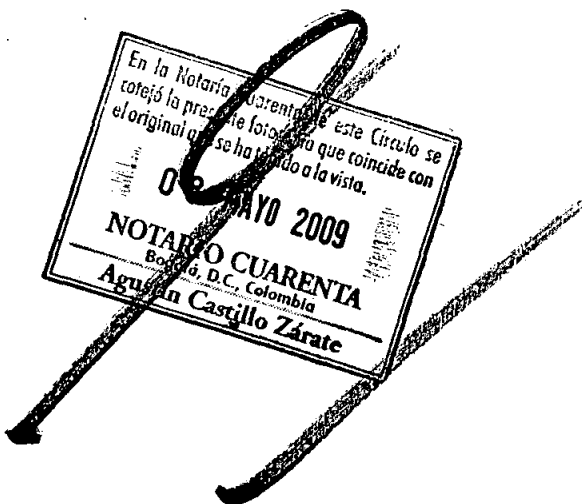
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este
Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un
Funcionario Autorizado, este 15 de Mayo de 2000.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

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

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

Certified

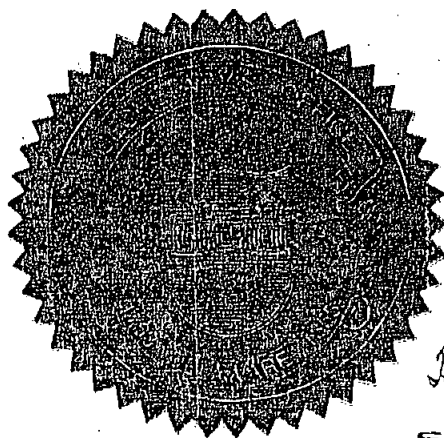
5. at Dover, Delaware

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

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254033

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State

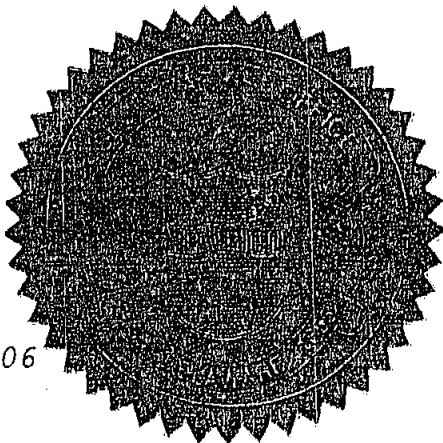


Delaware

PAGE 1

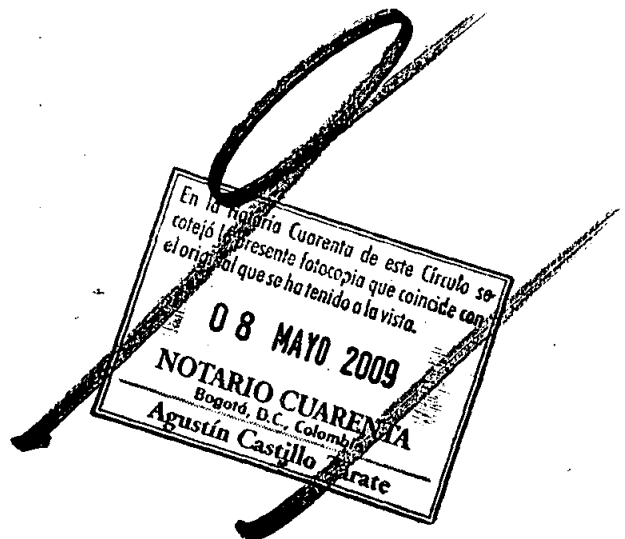
The First State

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



2112549

050426506



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900387

DATE: 05-24-05

CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

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

DOES HEREBY CERTIFY:

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

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

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

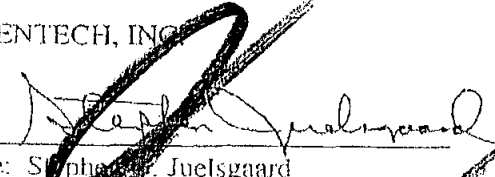
SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares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

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

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

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

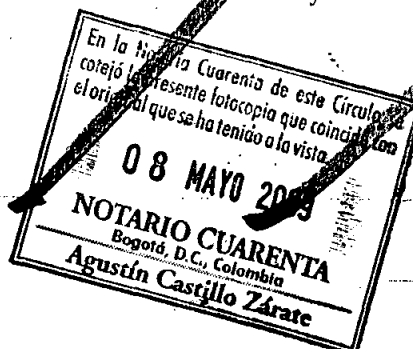
GENENTECH, INC.

By: 

Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Executive Vice President, General Counsel
and Secretary

#153087



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

APOSTILLA

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

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

Certificado

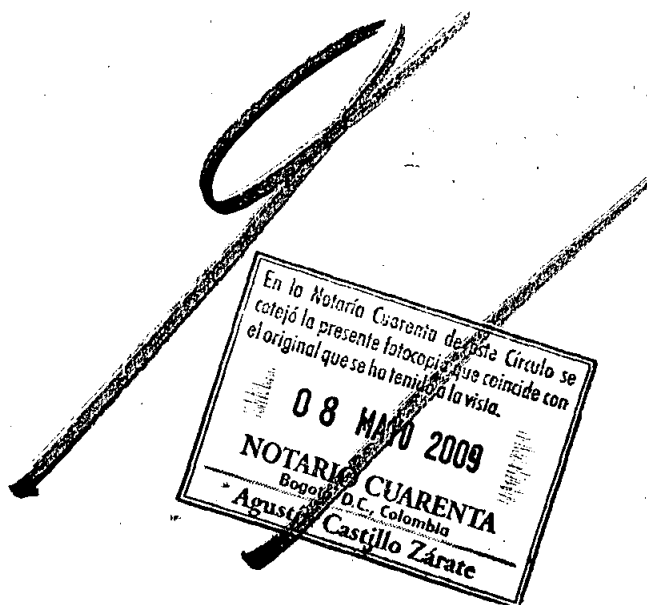
- 5. en Dover, Delaware
- 6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
- 7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
- 8. No. 0254033
- 9. Sello/timbre
- 10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

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



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

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

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

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

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

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

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

En la Notaría Cuarenta y dos de este Estado de
Bogotá, D.C., Colombia, el día 08 de Mayo del 2009, se
firmó la presente escritura pública que coincide con
el original que se ha tenido a la vista.

08 MAYO 2009

NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

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

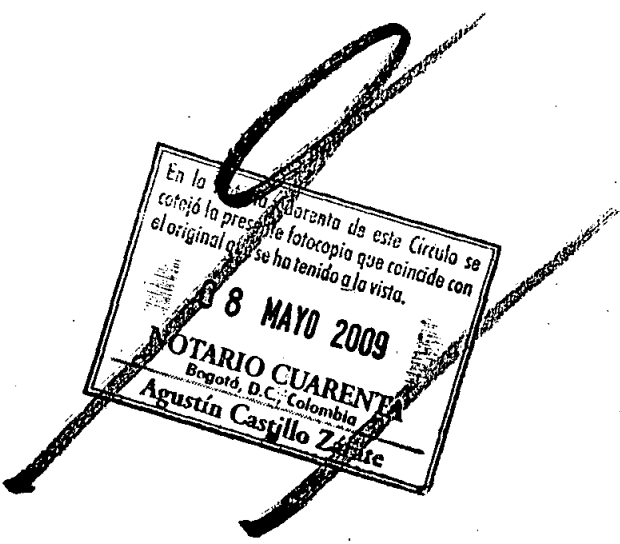
TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

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

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

GENENTECH, INC.

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



Apostille

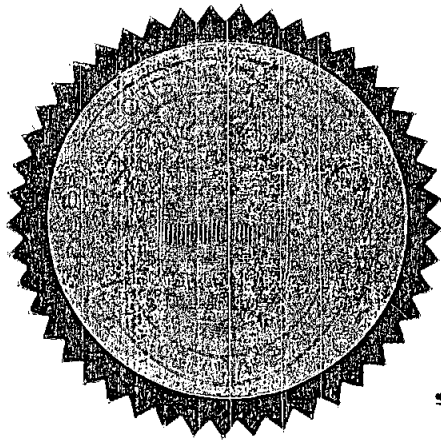
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

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

Certified

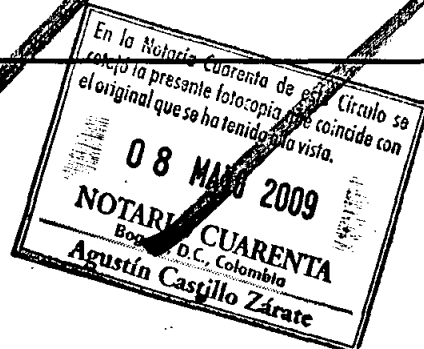
6. at Dover, Delaware
7. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005
8. by Secretary of State, Delaware Department of State
9. No. 0254032

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State

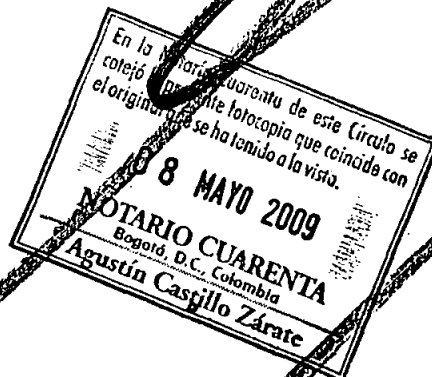
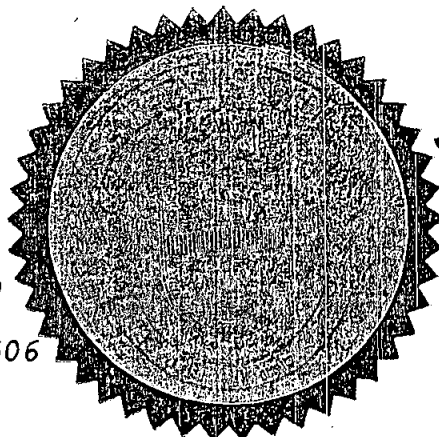


Delaware

PAGE 1

The First State

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



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900386

DATE: 05-24-05

162

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:

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

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

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

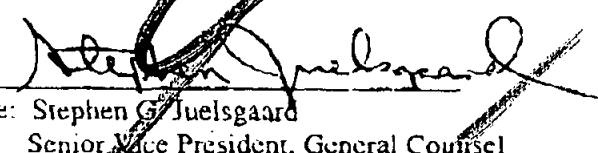
RESOLVED: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of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

RESOLVED: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 12 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

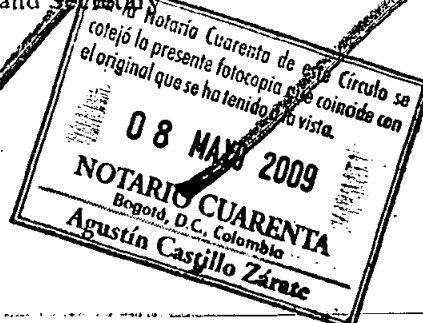
RESOLVED: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

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

GENENTECH, INC.

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

747



163

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

APOSTILLA

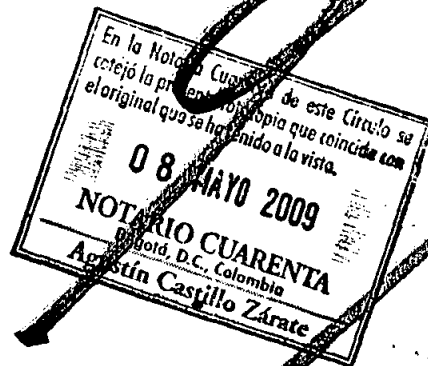
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

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

Certificado

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

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



164

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

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



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

FECHA: 05 - 24 - 05

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

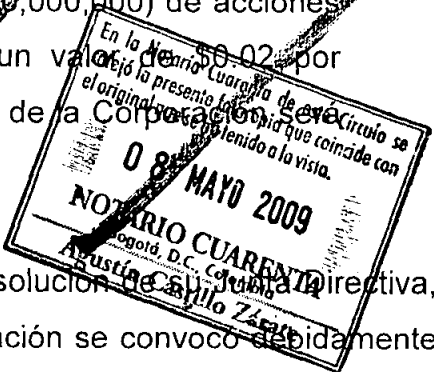
Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

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

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

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



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

TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo revisto 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

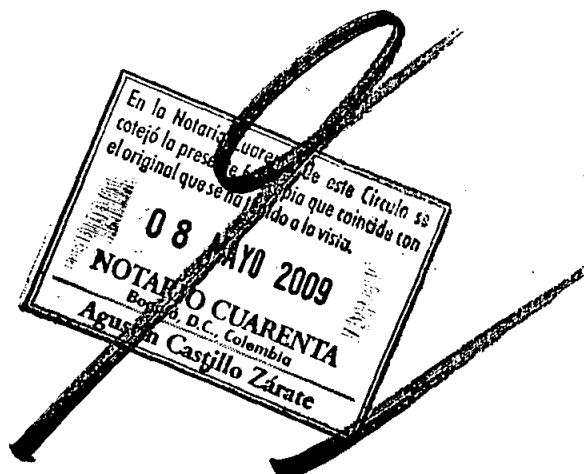
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 10 de Mayo de 2001.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.





mercio
ENCIA

REQUISITOS MÍNIMOS PARA ADMISIÓN PCT

PATENTE DE INVENCION

[}

MODELO DE UTILIDAD []

- | | | |
|---|---|-----|
| ◆ | Indicación de que se solicita la concesión de una patente | [X] |
| ◆ | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud | [X] |
| ◆ | Descripción de la invención | [X] |
| ◆ | Dibujos de ser estos pertinentes | [X] |
| ◆ | 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 []

Sandra Rodriguez
Firma Responsable

Fecha 18/10-24-9

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5,7y10^o
 Conmutador: 3 82 0840
 Fax: 3505220
 E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
 Bogotá D.C. - Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

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

REFERENCIA	Radicación No.	9 55632
	Solicitud internacional	PCT/US2007/083172
	Fecha inicio fase nacional	02/06/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	6919

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, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

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

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

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

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 19 JUN. 2009
jfernand