



No. 10-076884-00005-0000

Fecha: 2011-09-16 12:15:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 400 OPOSIOBSERVTER Folios: 39

Tra. 11 Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 400 lio: 39

Industria y Comercio
 SUPERINTENDENCIA

FORMULARIO UNICO DE OPOSICIÓN

①

OPOSICIÓN A:

- | | |
|--|--|
| ☒ Patente de Invención. | ☐ Marca Colectiva. |
| ☐ Patente de Modelo de Utilidad. | ☐ Marca de Certificación. |
| ☐ Diseño Industrial. | ☐ Lema Comercial. |
| ☐ Esquema de Trazado para Circuitos Integrados. | |
| ☐ Marcas de Productos o Servicios. | |

②

SOLICITUD
 PUBLICADA

Número del expediente: 10-076.884

Solicitante: SANOFL-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH

Apoderado: LUIS PATIÑO LEYVA

Título de la nueva creación o denominación del signo: **"NUEVOS DERIVADOS DE INSULINA CON PERFIL TIEMPO/ACCIÓN EXTREMADAMENTE RETARDADO"**

Gaceta: 629

③ OPOSICIÓN PRESENTADA POR:

SOLICITANTE	Nombre: PROCAPS S.A.	IDENTIFICACIÓN	
	Dirección: CALLE 80 No. 78b-291	C.C. ☐ NI. ☒	
	Nacionalidad o Domicilio: COLOMBIA	C.E. ☐ Otro ☐	
	Lugar de Constitución: BARRANQUILLA	Cual	
	Telefono: 371 99 00 Fax: 373 6815	Número	890.196.527-5
	E-mail:		
REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: ELIANA ISAURA MORENO BOHORQUEZ	IDENTIFICACIÓN	
	Dirección: CARRERA 104 N°119-95 OF 104	C.C. ☒ NIT ☐	
	Telefono: 2131213 Fax: 6121979	C.E. ☐ Otro ☐	
	E-mail: negocios@optimum-co.com	Cual	
		Número	51.975.664 TP 83823

④ FUNDAMENTOS DE LA OPOSICIÓN:

Art. 14, 16, 18, 20 y 36 de la Decisión 486 de la CAN

Causal: No cumple con los requisitos de patentabilidad.

Signo opositor:

Justificación:

La presente solicitud no cumple con los requisitos de patentabilidad dado que lo revelado, ya se encontraba en el estado de la técnica o es posible derivarlo de la misma tal y como se demostrará en el capítulo "Fundamento de Hechos".

⑤ Comprobante de pago No.

11-0091253

Fecha

6/09/2011

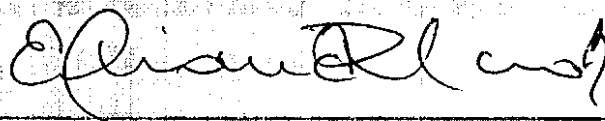
⑥ ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☒ Pruebas de los fundamentos de la oposición.
- ☐ Documentos que acrediten el legítimo interés, si fuere el caso.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.

⑦

NOMBRE: ELIANA ISAURA MORENO BOHORQUEZ

FIRMA:



C.C. 51.975.664

TP. 83823



Derecho de la Competencia, Propiedad
Industrial y Comercio Exterior

Señor Director,
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Referencia : Expediente N° 10 076.884
Asunto : Oposición a la solicitud de patente de Invención titulada
"NUEVOS DERIVADOS DE INSULINA CON PERFIL
TIEMPO/ACCIÓN EXTREMADAMENTE RETARDADO"
Solicitante : SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH
Opositora : PROCAPS S.A.

Publicada en la Gaceta de la Propiedad Industrial
N° 629 del 20 de junio de 2011

Yo, *ELIANA ISAURA MORENO BOHORQUEZ*, abogada en ejercicio, identificada como aparece al pie de su firma, con tarjeta profesional No. 83823 del Consejo Superior de la Judicatura, en mi condición de apoderada de la sociedad PROCAPS S.A. conformada bajo las leyes de la República de Colombia, atentamente manifiesto que estando dentro del término de ley y por orden expresa de mi representada, presento oposición a la concesión del registro de la Patente de Invención titulada "NUEVOS DERIVADOS DE INSULINA CON PERFIL TIEMPO/ACCIÓN EXTREMADAMENTE RETARDADO", cuyo titular es SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH, y pido a Usted declarar fundada esta oposición y en consecuencia negar el registro de la patente solicitada.

1. INTERÉS PARA ACTUAR

Conforme a lo dispuesto en el artículo 42 de la Decisión 486 de 2000 de la CAN, estando dentro del término estipulado por la ley, manifiesto el legítimo interés de nuestra representada para oponerse al registro de la patente de la referencia, atendiendo a que la solicitud pretendida no cumple con los requisitos dispuestos en la ley como se analizará más adelante y de ser concedida afectaría directamente la

comercialización de algunos productos de mi representada, que contienen, en particular **insulina**. Por lo tanto, solicito respetuosamente a ese Despacho se sirva tener en cuenta la presente oposición dentro del trámite administrativo que se surte en esta Superintendencia.

2. FUNDAMENTOS DE HECHOS

2.1. La solicitud objeto de la presente fue presentada el 25 de junio de 2010, reivindicando prioridad bajo la solicitud DE200810003566 del 2008-01-09; y fue publicada en Colombia, en la Gaceta de la Propiedad Industrial N° 629 del 20 de junio de 2011, cuya publicación internacional corresponde a la WO 2009087082 del 2009-07-16.

2.2. La solicitud colombiana 10 076.884 objeto de la presente oposición, se refiere a nuevos análogos de insulina con perfil basal de tiempo/acción, que se caracterizan por la adición y/o sustitución de residuos aminoácidos cargados negativa y positivamente, y una amidación del grupo carboxi C-terminal de la cadena B e histidina en la posición 8 de la cadena A de la insulina, a su preparación y uso.

2.3. Ahora bien, con base en el artículo 14 de la Decisión 486 de la CAN consagra lo siguiente: *"Los países miembros otorgarán patentes para las invenciones, sean de producto o procedimiento, en todos los campos de la tecnología, siempre que sean nuevas, tengan nivel inventivo y sean susceptibles de aplicación industrial"*. Así las cosas, las invenciones objeto de patente deben ser nuevas y tener nivel inventivo. Bien, pues antes de la fecha de prioridad de esta solicitud se encuentran los siguientes documentos que afecta la patentabilidad de la presente solicitud:

- D1: WO 2007081824 publicada el 19 de julio de 2007.

2.4. Ahora bien, el documento D1, particularmente en la descripción revela sistemas de protección de proteínas contra la fibrilación que comprende la adición y/o sustitución de ciertas histidinas en la proteína, de tal manera que un par de histidinas presentes con un espacio suficiente permiten que las histidinas se

coordinen con el zinc. Según D1, en el caso de la insulina, la adición y/o sustitución de histidina en los residuos A4 y A8 en conjunto o una sustitución de residuos de histidina en el residuo B1, ofrece una mayor resistencia a la fibrilación, manteniendo al menos en una mayoría la actividad del análogo de la insulina. En D1, también se indica que la adición y/o sustitución de residuos de histidina en el residuo A8 restaura al menos una parte de la resistencia a la fibrilación que pueden haber sido afectados por las sustituciones presentes en la cadena B, como los presentes en las insulinas de rápida acción. Igualmente, define que las proteínas protegidas por sustituciones de histidina se pueden utilizar para proporcionar una composición farmacéutica; y, un método para tratar a un paciente que incluye la administración de una cantidad fisiológicamente efectiva de la composición farmacéutica para el paciente. Particularmente, en el ejemplo así como en la última línea de la página 5, el documento D1 revela el uso de la histidina (i) por separado en la posición B1, (ii) por separado en la posición A8, (iii) en la A8 en combinación con histidina también en A4, o (iv) en forma conjunta en las posiciones B1, A4, y el A8 para compensar la inestabilidad de los análogos de insulina que contienen sustituciones de aminoácidos en la cadena B (por ejemplo, pero no se limita a las sustituciones en la posición B28 y/o la posición B29) con el fin de aumentar su resistencia a la fibrilación. Así las cosas, como lo evidencia dicho documento D1, la presente solicitud no es novedosa pues lo revelado ya se encontraba en el estado de la técnica.

2.5. Por lo tanto, este documento objeto de oposición a la luz del documento D1 carece evidentemente de NOVEDAD.

2.6. En consecuencia y de acuerdo a lo descrito anteriormente, se deriva que la solicitud colombiana 10 076.884 no puede pretender un monopolio por patente toda vez que lo que pretende no cumple con uno de los tres requisitos necesarios para su protección.

2.7. Que por consiguiente, respecto a la solicitud pretendida se tiene que:

2.7.1. **CARECE DE NOVEDAD**: Según la decisión 486 de la Comunidad Andina de Naciones, Artículo 16.- *“Una invención se considerará nueva cuando no está comprendida en el estado de la técnica. El estado de la técnica comprenderá todo lo que haya sido accesible al público por una descripción escrita u oral, utilización,*

comercialización o cualquier otro medio antes de la fecha de presentación de la solicitud de patente o, en su caso, de la prioridad reconocida.”. A la fecha de prioridad, 9 de enero de 2008 ya era conocido, pues como se demostró, era parte del arte anterior con base en el documento D1, análogos de insulina con perfil basal de tiempo/acción, que se caracterizan por la adición y/o sustitución de residuos aminoácidos cargados negativa y positivamente, y una amidación del grupo carboxi C-terminal de la cadena B e histidina en la posición 8 de la cadena A de la insulina, sobre el cual busca protección en el capítulo reivindicatorio.

2.8. Dado lo anterior, es posible deducir que la solicitud y lo reivindicado no es objeto de patentabilidad pues es contrario a lo que dicta la Decisión 486 de la Comunidad Andina de Naciones, Artículo 14.- *“Los Países Miembros otorgarán patentes para las invenciones, sean de producto o de procedimiento, en todos los campos de la tecnología, siempre que sean nuevas, tengan nivel inventivo y sean susceptibles de aplicación industrial.”*. La solicitud pretendida no cumple con los tres requisitos de patentabilidad.

2.9. Por todo lo anterior, atentamente solicito a usted que se sirva declarar fundada ***“NUEVOS DERIVADOS DE INSULINA CON PERFIL TIEMPO/ACCIÓN EXTREMADAMENTE RETARDADO”***, cuyo titular es SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH, solicitud Colombiana que apareció publicada en la Gaceta de la Propiedad Industrial N° 629 del 20 de junio de 2011.

3. PRUEBAS

De conformidad con lo dispuesto por las normas vigentes, solicito a usted tener como prueba en este asunto los siguientes:

- D1: WO 2007081824 publicada el 19 de julio de 2007.

4. FUNDAMENTO DE DERECHO

Fundamento esta observación en las normas legales siguientes:

- 4.1. Numeral 1 del artículo 586 del Código de Comercio.
- 4.2. Artículo 42 de la Decisión 486 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena.
- 4.3. En las demás normas concordantes.

5. ANEXOS

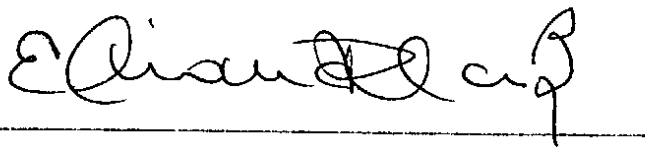
Para los efectos correspondientes anexo al presente escrito los siguientes documentos:

1. Poder para actuar en el presente.
 2. Documento que acredita al representante legal de PROCAPS S.A.
 - 3.
 4. Recibo de caja del respectivo pago de tasa.
 5. Copias de los documentos:
- D1: WO 2007081824 publicada el 19 de julio de 2007.

6. NOTIFICACIONES

Para efectos de notificaciones que por disposición del artículo 50 del Decreto 01 de 1984 debe hacer su Despacho, informo que mi representada y la suscrita recibiremos notificaciones en la Secretaría de su Despacho o en mis oficinas situadas en la Carrera 13 N° 119-95, Of. 104 de esta ciudad de Bogotá.

Señor Superintendente,



ELIANA ISAURA MORENO BOHORQUEZ

C.C. 51'975.664 de Bogotá

T.P.A. 83823 del C.S. de la J.

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0091253

Bogotá D.C., Septiembre 16 de 2011 - 11:34:47

RECIBIDO DE : PROCAPS S.A.

NI 890.106.527

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	382192473	27/07/2011	2.432.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-04	PRESENTACION DE OBSERVACIONES A SOLICITUDES	12	MARCAS Y LEMAS COMERCIALES
			304.000.00	304.000.00
				\$304.000.00

SON: **TRES CIENTOS CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-076884- -00005-0000

Fecha: 2011-09-16 12:15:24 Dep. 2020 DIR. NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASE NACIONAL I
Act. 400 OPOSIOBSERVTER Folios: 39

Fecha: 2011-09-16 12:15:24 Dep. 2020 DIR. NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASE NACIONAL I
Act. 400 OPOSIOBSERVTER Folios: 38

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Septiembre 16 de 2011 - 11:34:47



PODER ESPECIAL

Yo, **WALTER TANAKA TATEKAWA**, mayor de edad y vecino de la ciudad de Barranquilla (Colombia), identificado como aparece al pie de mi firma, quien en el presente documento actúa en calidad de Representante Legal de la sociedad **PROCAPS S.A.** sociedad legalmente constituida y domiciliada en la ciudad de Barranquilla (Colombia), por el presente documento otorgo a la doctora **ELIANA ISAURA MORENO BOHORQUEZ**, abogada en ejercicio, identificada como aparece al pie de su firma, con tarjeta profesional No. 83823 del C.S. de la J., poder especial, amplio y suficiente, para formular oposiciones u observaciones a la solicitud de patente No. 10 076.884, titulada "NUEVOS DERIVADOS DE INSULINA CON PERFIL TIEMPO/ACCIÓN EXTREMADAMENTE RETARDADO", cuyo titular es **SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH**, publicada en la gaceta No. 629 del 20 de Junio de 2011.

Nuestro apoderado queda facultado, de manera expresa, para realizar todo tipo de actos necesarios para llevar a cabo el trámite de la oposición, incluyendo, sin limitación, preparar y presentar solicitudes, hacer declaraciones, pagar tasas, contribuciones e impuestos, recabar los títulos o certificados. Asimismo quedan autorizados para impugnar administrativamente todo lo que fuere resuelto en el expediente a que se hace expresa referencia en el presente poder, con todas las facultades generales y específicas que fuera requerido para ella.

De la misma manera, además de las facultades que le confiere la naturaleza del presente mandato, se encuentran facultados para recibir, desistir, transigir, sustituir, y reasumir el presente poder, incoar acciones, interponer recursos y demás facultades conferidas por la ley.

Dado y Firmado en Barranquilla (Colombia) a los 8 días del mes de Septiembre de 2011.

PROCAPS S.A.

C.C. N° 16'251.923

NIT: 890.106.527-5

Representante Legal

APROBADO

- 8 SET. 2011

PROCAPS S.A.

Acepto:

ELIANA ISAURA MORENO BOHORQUEZ

C.C. 51'975.664 de Bogotá

T.P.A. 83823 del C.S. de la J.

NOTARIA 3^{era} NOTARIA TERCERA DEL CIRCULO DE BARRANQUILLA
DILIGENCIA DE RECONOCIMIENTO
Ante el Notario Tercero de Barranquilla se presento:
WALTER TANAKA TATEKAWA
identificado con: CC 16.257.923 PALMIRA
Y declaro que el contenido del anterior Documento es cierto
y suya la firma que lo respalda.
Barranquilla: 12 SET, 2011

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]
NOTARIA TERCERA DEL CIRCULO
DE BARRANQUILLA
ALFONSO LUIS ARAFAZ
NOTARIO



***** Pag. 1

C A M A R A D E C O M E R C I O
D E B A R R A N Q U I L L A

05*****

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O DE INSCRIPCION DE DOCUMENTOS.

PROCAPS S.A.-----

NIT: 890.106.527-5.

EL SUSCRITO SECRETARIO DE LA CAMARA DE COMERCIO DE BARRANQUILLA, CON FUNDAMENTO EN LAS INSCRIPCIONES DEL REGISTRO MERCANTIL:

C E R T I F I C A

Que por Escritura Pública No. 1,190 del 22 de Julio de 1976, otorgada en la Notaria Tercera de Barranquilla, inscrito(as) en esta Cámara de Comercio, el 28 de Julio de 1976 bajo el No. 6,070 del libro respectivo, fue constituida la sociedad-----
limitada denominada "PRODUCTORA DE CAPSULAS DE GELATINAS LIMITADA
"PROCAPS LIMITADA".-----

C E R T I F I C A

Que por Escritura Pública No. 1,307 del 28 de Junio de 1979, otorgada en la Notaria Tercera de Barranquilla, inscrito(as) en esta Cámara de Comercio, el 23 de Julio de 1979 bajo el No. 10,039 del libro respectivo, la sociedad antes mencionada-----
se transformo en sociedad anonima bajo la denominacion social de
"PRODUCTORA DE CAPSULAS DE GELATINA S.A." PROCAPS S.A.".-----

C E R T I F I C A

Que por Escritura Pública No. 3,810 del 31 de Dic/bre de 1980, otorgada en la Notaria Primera de Barranquilla, inscrito(as) en esta Cámara de Comercio, el 30 de Enero de 1981 bajo el No. 12,705 del libro respectivo, la sociedad antes mencionada-----
se transformo en sociedad de responsabilidad limitada bajo al razon
social de "PRODUCTORA DE CAPSULAS DE GELATINA LIMITADA "PROCAPS LI -
MITADA".-----

C E R T I F I C A

Que por Escritura Pública No. 3,755 del 10 de Nov/bre de 1983, otorgada en la Notaria Unica de Soledad, inscrito(as) en esta Cámara de Comercio, el 22 de Nov/bre de 1983 bajo el No. 17,922 del libro respectivo, la sociedad antes mencionada-----
se transformo en sociedad anonima bajo la denominacion social de
"PRODUCTORA DE CAPSULAS DE GELATINA S.A." PROCAPS S.A.".-----

C E R T I F I C A

Que por Escritura Pública No. 3,615 del 06 de Dic/bre de 1996, otorgada en la Notaria 2a. de Barranquilla, inscrito(as) en esta Cámara de Comercio, el 20 de Dic/bre de 1996 bajo el No. 67,218 del

***** C O N T I N U A *****

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O DE INSCRIPCION DE DOCUMENTOS.

PROCAPS S.A.-----

NIT: 890.106.527-5.

libro respectivo, la sociedad antes mencionada-----
cambio de razon social, por la denominacion LABORATORIOS PROCAPS S.A

C E R T I F I C A

Que por Escritura Pública No. 3,775 del 18 de Dic/bre de 1996, otorgada en la Notaria 2a. de Barranquilla, inscrito(as) en esta Cámara de Comercio, el 23 de Enero de 1997 bajo el No. 67,704 del libro respectivo, la sociedad antes mencionada-----
cambio de razon social, por la denominacion PROCAPS S.A. -----

C E R T I F I C A

Que dicha sociedad ha sido reformada por las siguientes escrituras y/o documentos privados:

Número	aaaa/mm/dd	Notaria	No. Insc o Reg	aaaa/mm/dd
39	1979/01/18	Notaria 3a. de Barranquilla.	9,452	1979/01/24
992	1981/04/30	Notaria 1a. de Barranquilla.	13,112	1981/05/06
1,464	1982/08/27	Notaria Unica de Soledad	15,533	1982/09/08
2,744	1983/08/18	Notaria Unica de Soledad	17,416	1983/08/26
3,826	1984/07/16	Notaria Unica de Soledad	19,554	1984/07/27
3,835	1985/08/26	Notaria Unica de Soledad	22,230	1985/09/04
2,260	1986/09/10	Notaria Unica de Soledad.	24,995	1986/09/15
1,849	1989/07/11	Notaria 2a. de Barranquilla	33,909	1989/07/13
444	1990/02/21	Notaria 2a. de Barranquilla	36,101	1990/03/16
3,090	1991/12/17	Notaria 2a. de Barranquilla	43,993	1992/01/28
269	1993/02/01	Notaria 2a. de Barranquilla	48,428	1993/02/16
2,342	1993/07/28	Notaria 2a. de Barranquilla	50,582	1993/08/10
3,652	1993/11/09	Notaria 2a. de Barranquilla	51,798	1993/11/22
3,615	1996/12/06	Notaria 2a. de Barranquilla	67,218	1996/12/20
89	1997/01/16	Notaria 2a. de Barranquilla	67,704	1997/01/23
2,070	1997/07/17	Notaria 2a. de Barranquilla	70,627	1997/07/31
2,281	1997/08/04	Notaria 2a. de Barranquilla	70,813	1997/08/14
765	1999/04/22	Notaria 3a. de Barranquilla	80,628	1999/04/23
459	2001/02/21	Notaria 2a. de Barranquilla	91,502	2001/02/23
2,608	2001/10/05	Notaria 2a. de Barranquilla	95,771	2001/11/08
1,730	2004/07/29	Notaria 2. de Barranquilla	112,999	2004/08/26
416	2005/03/03	Notaria 2. de Barranquilla	116,364	2005/03/10
1,613	2005/07/28	Notaria 2. de Barranquilla	119,322	2005/08/18
710	2009/05/05	Notaria 3 a. de Barranquilla	150,130	2009/06/30
1,054	2009/06/25	Notaria 3 a. de Barranquilla	150,130	2009/06/30

C E R T I F I C A

Que de acuerdo con la(s) escritura(s) arriba citada(s), la sociedad se rige por las siguientes disposiciones:

DENOMINACION O RAZON SOCIAL:

PROCAPS S.A.-----

SIGLA: PROCAPS.

DOMICILIO PRINCIPAL: Barranquilla.

NIT No: 890.106.527-5.

MATRICULA MERCANTIL: 24,802.

***** C O N T I N U A *****



***** Pag. 2

CAMARA DE COMERCIO
DE BARRANQUILLA

05*****

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O DE INSCRIPCION DE DOCUMENTOS.

PROCAPS S.A.-----

NIT: 890.106.527-5.

C E R T I F I C A

Direccion para notificaciones judiciales:

CL 80 No 78 B - 201.

De la ciudad de Barranquilla.

Correo

electrónico:

mlozada@procaps.com.co

Pagina Web:

Telefono:

3719272

C E R T I F I C A

DURACION: Que la sociedad no se halla disuelta y su término de
duración se fijó hasta el
18 de Agosto de 2073.

C E R T I F I C A

OBJETO SOCIAL: El objeto principal de la sociedad sera: a) La fabricacion, importacion y comercializacion de alimentos procesados y suplementos dietarios. b) La fabricacion de capsulas y otros productos similares a partir de materiales tales como gelatinas u otros de distinta naturaleza, que puedan ser utilizados como envases o recipientes de productos y sustancias quimicas, farmaceuticas, alimenticias y cosmeticas, para uso y consumo humano y veterinario. c) La investigacion, desarrollo y fabricacion de toda clase de productos y sustancias quimicas, farmaceuticas, alimenticias y cosmeticas para uso y consumo humano, animal y vegetal. d) La compra y venta de materias primas, insumos y productos intermedios necesarios para los procesos de fabricacion de sustancias quimicas, farmaceuticas, alimenticias y cosmeticas, asi como la comercializacion interna y externa de los productos terminados. e) La compra, venta, importacion, exportacion y distribucion de toda clase de elementos instrumentales y equipos medicos, quirurgicos, odontologicos y hospitalarios para la salud humana y animal. f) La compra, venta, exportacion, fabricacion, importacion, distribucion de dulces, confites, galletas y todo tipo de golosinas o alimentos para el consumo humano. g) Actuar como representante o agente de personas naturales y juridicas, nacionales y extranjeras en la realizacion de operaciones o transacciones relacionadas con la industria farmaceutica y en especial con cualquiera de las actividades descritas en los literales a), b), c), d) y e) antes descritos. h) Prestar los servicios de asesorias y consultoria en las areas administrativas, de mercadeo, analisis clinico, asistencia tecnica, investigacion,

***** C O N T I N U A *****

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O DE INSCRIPCION DE DOCUMENTOS.

PROCAPS S.A.

NIT: 890.106.527-5.

costos y produccion, exportaciones, importaciones, ventas, relacionadas con iguales o similares actividades a las que constituyen el objeto de PROCAPS S.A., asi como los de publicidad y promocion de productos quimicos, alimenticios, cosmeticos y farmaceuticos para uso humano, animal o industrial. i) Adquirir, operar, administrar y explotar, a cualquier titulo, empresa o establecimientos dedicados a la investigacion, desarrollo, fabricacion o comercializacion de productos quimicos, farmaceuticos, alimenticios, hospitalarios o cosmeticos. En desarrollo de su objeto principal, la sociedad podra tomar interes social como accionista, socio o fundador de empresas que tengan igual o similar objeto, comprar, vender, importar y exportar maquinarias, insumos y repuestos requeridos para el desarrollo de sus actividades; tomar dinero en prestamo, financiar y garantizar las operaciones comerciales que celebre con terceros relativas a su objeto; celebrar y ejecutar todo tipo de actos y contratos necesarios para desarrollar sus operaciones; girar, aceptar, otorgar y protestar todo tipo de titulos valores e instrumentos negociables, comprar, vender y constituir gravámenes sobre bienes muebles e inmuebles, designar representantes apoderados en el pais y en el exterior y, en general, realizar cualquier acto o negocio que sea necesario o conveniente para el desarrollo de su objeto social y para la mejor proteccion de sus intereses corporativos o la de sus socios. La sociedad podra garantizar el cumplimiento de sus obligaciones adquiridas por terceros o por sus socios, para lo cual podra inclusive constituir gravámenes reales sobre sus bienes de cualquier naturaleza.

C E R T I F I C A D O
DE SANCAYANQUILLA

CAPITAL	Nro Acciones	Valor Acción
Autorizado		
\$*****2,000,000,000	*****2,000,000	*****1,000
Suscrito		
\$*****1,298,000,000	*****1,298,000	*****1,000
Pagado		
\$*****1,298,000,000	*****1,298,000	*****1,000

C E R T I F I C A

ADMINISTRACION: La direccion y administracion de la sociedad correspondera a la Asamblea General de Accionistas, a la Junta Directiva, al Presidente, al Vicepresidente y a un Gerente General. Corresponde a la Junta Directiva las siguientes funciones y atribuciones entre otras: Autorizar cualquier acto o contrato cuya cuantia sea superior al equivalente en pesos Colombianos a doscientos cincuenta mil dolares de los Estados Unidos de America (US\$250.000), liquidados a la tasa de cambio representativa del mercado vigente el dia en que se surta la transacion. Cuando se trate de operaciones en virtud de las cuales la sociedad garantice obligaciones de terceros o de los socios, se requerira que la operacion sea aprobada con el voto de por lo menos 2/3 partes de los integrantes de la Junta Directiva. La sociedad tendra un Presidente, quien ejercera la representa-

***** C O N T I N U A *****



***** Pag. 3

C A M A R A D E C O M E R C I O
D E B A R R A N Q U I L L A

05*****

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O DE INSCRIPCION DE DOCUMENTOS.

PROCAPS S.A.-----

NIT: 890.106.527-5.

cion legal de la sociedad y tendra las siguientes atribuciones entre otras: Ejecutar las decisiones de la Asamblea General de Accionistas y de la Junta Directiva. Ejercer la Representacion Legal de la sociedad en todos los actos y contratos que se requieran para el desarrollo del objeto social, de conformidad con lo previsto en las leyes y en los presentes estatutos. Constituir apoderados judiciales y extrajudiciales, recibir notificaciones, absolver interrogatorios de parte, confesar obligaciones de la sociedad, transigir, disistir y allanar a la sociedad en cualquier asunto judicial. Aprobar y celebrar en nombre de la socieda todo acto o contrato cuya cuantia sea igual o inferior al equivalente en pesos colombianos a doscientos cincuenta mil dolares de los Estados Unidos de America (US\$250.000), liquidados a la tasa de cambio representativa del mercado vigente el dia en que se surta la transacion o celebracion del acto. Las demas funciones que le correspondan como Representante Legal por disposicion de la ley, de estos estatutos o de la Junta Directiva. El Presidente tendra un suplente, designado por la Junta Directiva, quien reemplazara al Presidente en sus faltas temporales, absolutas o meramente accidentales, con entidades facultades y sin que sea necesario para ello acreditar la ausencia del principal. La sociedad tendra un Vicepresidente designado por la Junta Directiva, quien tambien ejercera la representacion legal de la sociedad, pudiendo ejercerla conjunta o separadamente con el Presidente. El vicepresidente tendra las siguientes facultades entre otras. Ejecutar dentro de su competencia las decisiones de la Asamblea General de Accionistas, de la Junta Directiva y del Presidente. Ejercer la representacion legal de la sociedad en todos los actos y contratos que se requieran para el desarrollo del objeto social, de conformidad con lo previsto en las leyes y en los presentes estatutos. Constituir apoderados judiciales y extrajudiciales, recibir notificaciones, absolver interrogatorios de parte, confesar obligaciones de la sociedad, transigir, desistir y allanar a la sociedad en cualquier asunto judicial. Aprobar y celebrar en nombre de la sociedad todo acto o contrato cuya cuantia sea igual o inferior al equivalente en pesos colombianos a ciento cincuenta mil dolares de los Estados Unidos de America (US\$150.000), liquidados a la tasa de cambio representativa del mercado vigente el dia en que se surta la aprobacion o celebracion del acto, siempre que no se trate de enajenar bienes inmuebles o cualquier otro activo fijo de la sociedad, inclusive de naturaleza muebles, acciones, cuotas o partes de interes inversiones y todo tipo de derechos de la sociedad, o de constituir gravámenes sobre cualquiera de los anteriores, facultades que radican exclusiva y privativamente en cabeza del Presidente. Las demas funciones que le corresponda como Representante legal por disposicion de la ley, de estos estatutos

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O DE INSCRIPCION DE DOCUMENTOS.

PROCAPS S.A.

NIT: 890.106.527-5.

o de la Junta Directiva. El Vicepresidente tendra (1) suplente, designado por la Junta Directiva, quien lo reemplazara conjunta o separadamente en sus faltas temporales, absolutas o meramente accidentales, con identicas facultades y sin que sea necesario para ello acreditar la ausencia del principal. La sociedad tendra un (1) Gerente General, con su respectivo Suplente, designados por la Junta Directiva. El Suplente reemplazara al Gerente General, en sus faltas temporales, absolutas o meramente accidentales, quien junto con el gerente general, llevaran la representacion legal de la sociedad, con identicas facultades, pudiendolas ejercer conjunta o separadamente con el Presidente y Vicepresidente, con identicas facultades que el Gerente General y sin que sea necesario para ello acreditar la ausencia del titular. El Gerente General tendra las siguientes facultades entre otras: Ejercer la representacion legal de la sociedad, en todos los actos y contratos que se requieran para el desarrollo del objeto social, de conformidad con lo previsto en las leyes y en los presentes estatutos. Aprobar y celebrar en nombre de la sociedad todo acto o contrato cuya cuantia sea igual o inferior al equivalente en pesos Colombianos a Cincuenta Mil dolares de los Estados Unidos de America (US\$50.000), liquidados a la tasa de cambio representativa del mercado vigente el dia en que se surta la aprobacion o celebracion del acto, siempre que no se trate de enajenar a cualquier titulo bienes inmuebles o cualquier otro activo fijo de la sociedad, inclusive de naturaleza mueble, acciones, cuotas o partes de interes, inversiones y todo tipo de derechos de la sociedad o de constituir gravámenes sobre cualquiera de las anteriores facultades que radican exclusiva y privativamente en cabeza del Presidente.

DE BARRANQUILLA
C E R T I F I C A

Que según Acta No. 116 del 27 de Junio de 1997 correspondiente a la Asamblea de Accionistas en Barranquilla, de la sociedad:

PROCAPS S.A.

cuya parte pertinente se inscribió en esta Cámara de Comercio, el 15 de Agosto de 1997 bajo el No. 70,838 del libro respectivo, y según Acta No. 127 del 22 de Marzo de 2000 correspondiente a la Asamblea de Accionistas en Barranquilla, de la sociedad:

PROCAPS S.A.

cuya parte pertinente se inscribió en esta Cámara de Comercio, el 29 de Mayo de 2000 bajo el No. 87,250 del libro respectivo, fueron hechos los siguientes nombramientos:

CLASE: JUNTA DIRECTIVA

Principales

1. Minski Gontovnik Ruben	CC.*****7,463,982
2. Minski Gontovnik Meyer	CC.*****7,461,324
3. Minski Gontovnik Jose	CC.*****8,671,834

Suplentes

1. Minski Zirberblum Elliot	CC.*****72,219,541
2. Minski Deitel Daniel	*****

***** C O N T I N U A *****



***** Pag. 4
C A M A R A D E C O M E R C I O
D E B A R R A N Q U I L L A
05*****

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O DE INSCRIPCION DE DOCUMENTOS.

PROCAPS S.A.-----
NIT: 890.106.527-5.

3. Minski Sharon

PA.*990,212,082,805

C E R T I F I C A

Que según Acta No. 116 del 27 de Junio de 1997 correspondiente a la Asamblea de Accionistas en Barranquilla, de la sociedad: PROCAPS S.A. cuya parte pertinente se inscribió en esta Cámara de Comercio, el 15 de Agosto de 1997 bajo el No. 70,838 del libro respectivo, fueron hechos los siguientes nombramientos:

Cargo/Nombre	Identificación
Presidente.	
Minski Gontovnik Ruben	CC.*****7,463,982
Suplente del Presidente	
Minski Minski Abraham.	CC.*****802,575
Vicepresidente	
Minski Gontovnik Meyer	CC.*****7,461,324
Suplente del vicepresidente	
Minski Gontovnik Jose	CC.*****8,671,834

C E R T I F I C A
DE BARRANQUILLA

Que según Acta No. 11 del 01 de Febrero de 2001 correspondiente a la Junta Directiva en Barranquilla, de la sociedad: PROCAPS S.A. cuya parte pertinente se inscribió en esta Cámara de Comercio, el 12 de Febrero de 2001 bajo el No. 91,273 del libro respectivo, fueron hechos los siguientes nombramientos:

Cargo/Nombre	Identificación
Gerente General.	
Uribe Ochoa Guillermo Luis	CC.*****70,073,754

C E R T I F I C A

Que según Acta No. 406 del 02 de Sep/bre de 2004 correspondiente a la Junta Directiva en Barranquilla, de la sociedad: PROCAPS S.A. cuya parte pertinente se inscribió en esta Cámara de Comercio, el 09 de Sep/bre de 2004 bajo el No. 113,263 del libro respectivo, fueron hechos los siguientes nombramientos:

Cargo/Nombre	Identificación
Suplente del Gerente.	
Tanaka Tatekawa Walter	CC.*****16,251,923

C E R T I F I C A

Que según Acta No. 124 del 29 de Marzo de 1999 correspondiente a la Asamblea de Accionistas en Barranquilla, de la sociedad: PROCAPS

***** C O N T I N U A *****

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O DE INSCRIPCION DE DOCUMENTOS.

PROCAPS S.A.

NIT: 890.106.527-5.

S.A. cuya parte pertinente se inscribió en esta Cámara de Comercio, el 04 de Agosto de 1999 bajo el No. 82,226 del libro respectivo, fueron hechos los siguientes nombramientos:

Cargo/Nombre	Identificación
Revisor Fiscal Ppal.	
Vargas Pertuz Ana Isabel	CC.*****32,696,645

C E R T I F I C A

Que según Acta No. 158 del 17 de Junio de 2011 correspondiente a la Asamblea de Accionistas en Barranquilla, de la sociedad: PROCAPS S.A. cuya parte pertinente se inscribió en esta Cámara de Comercio, el 23 de Junio de 2011 bajo el No. 170,929 del libro respectivo, fueron hechos los siguientes nombramientos:

Cargo/Nombre	Identificación
Revisor Fiscal Suplente	
Rodríguez Rey Jose Luis	CC.*****72,001,912

C E R T I F I C A

Que por Escritura Pública No. 2,784 del 07 de Dic/bre de 2007, otorgada en la Notaria 2ª de Barranquilla cuya parte pertinente se inscribió en esta Cámara de Comercio, el 20 de Dic/bre de 2007 bajo el No. 3,492 del libro respectivo, y las inscripciones 3.492-1, 3.493, 3.494, 3.495, 3.496, 3.497, 3.498, 3.499, 3.500, 3.501, 3.502, 3.503, 3.504, 3.505, 3.506, 3.507, Consta que RUBEN MINSKI GONTOVNIK, C.C. No. 7.463.982, obrando como Presidente y Representante Legal de la sociedad C.I. NATURMEGA S.A., que obrando en su condición de Presidente y Representante Legal de la sociedad PROCAPS S.A., el presidente debidamente facultado por los Estatutos Sociales y por el Maximo Organó Social, otorga los siguientes poderes: Otorgar poder general, amplio y suficiente a los doctores JOSEFINA DEL CARMEN MIELES BUELVAS CC.No.33.138.497; a MARCELA CARVAJALINO PAGANO CC.No.22.579.748; CRISTINA VIOLI FRANCESCHINI CC.No.22.463.716, con las facultades que se transcriben a continuacion: a.- Para que representen a la sociedad PROCAPS S.A, ante todo tipo de autoridades administrativas y jurisdiccionales, en asuntos de naturaleza civil, laboral, comercial, penal, aduanera, cambiaria, tributaria, policiva, administrativa y fiscal. b.- Contestar y presentar demandas, requerimientos, recursos, pedir y aportar pruebas, recibir, notificarse, ejercer la accion de tutela, tramitar incidente de desacato, comparecer en los procesos que cursen contra la sociedad, allanarse en nombre de la sociedad en los asuntos que sean necesarios, transigir, desistir, sustituir, renunciar y reasumir el poder. c.- La facultad expresa de conciliar, por tanto pueden llegar a acuerdos conciliatorios, transaccionales, judiciales o extrajudiciales o extrajudiciales, cualquiera que sea su cuantia, para lo cual las apoderadas deben aportar la autorizacion simple y escrita del Representante legal de la sociedad. d.- Podran presentar solicitudes de devolucion y/o compensacion de impuestos, ventas y rentas, recibir los pagos por las devoluciones y adelantar todo tramite o proceso administrativo

***** C O N T I N U A *****



***** Pag. 5

C A M A R A D E C O M E R C I O
D E B A R R A N Q U I L L A

05*****

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O DE INSCRIPCION DE DOCUMENTOS.

PROCAPS S.A.-----

NIT: 890.106.527-5.

ante la DIAN, de tal forma que en ningun momento quede sin -----
representacion legal de la sociedad. PODERES ESPECIALES: a.- Se ----
confiere poder especial amplio y suficiente a las personas que se ----
determinan seguidamente, que conforman el grupo A y B, para, para
que conjuntamente suscriban contratos de suministros de mercancías
y servicios con entidades oficiales, hasta la suma de OCHOCIENTOS
MIL DOLARES DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA (US800.000.00), -----
liquidados a la tasa representativa del mercado vigente en el día
que se realice la respectiva transacción. Grupo A. WALTER NANAKA
TATEKAWA CC.No.16.251.923, CLAUDIA TANGARIFE CASTILLO -----
CC.No.41.660.293, CARMEN ALICIA FLOREZ CC.No.22.434.044, IVAN -----
VILLAREAL CAMACHO CC.No.91.201.749, CARMEN ALICIA HERRERA -----
DIAZGRANADOS CC.No.22.377.540, DAVID ANTONIO CHARRIS GIRALDO -----
CC.No.19.341.274, RICARDO DORADO HURTADO CC.No.79.715.772, JAIME
FORERO LLINAS CC.No.19.300.593. b.- Se confiere poder especial ----
amplio y suficiente al señor WILLIAM ALBERTO BARROS CERRA -----
CC.No.8.715.941, para que en nombre y representación de PROCAPS ----
S.A., suscriban declaraciones cambiarias, aduaneras y tributarias a
que este obligada la sociedad, en el giro normal de sus negocios y
operaciones sociales, por tanto quedan facultados para firmarlas,
como también los demás documentos relacionados con ellas, -----
notificarse, aportar y solicitar las pruebas que sean necesarias.
c.- Otorgar poder especial amplio y suficiente al señor MARLON ----
TATIS PAREDES CC.No.72.176.874 y al señor WILLIAM ALBERTO BARROS
CERRA CC.No.8.715.941, para que en nombre y representación de ----
PROCANPS S.A., suscriban las declaraciones, reportes y cualquier
documento relacionado con los trámites o registros de Comercio ----
Exterior y o cualquier entidad del Estado que haga sus veces: d)
Otorgar poder especial amplio y suficiente a la doctora CARMEN ----
ALICIA HERRERA DIAZGRANADOS, CC.No.22.377.540 y al doctor WALTER
TANAKA TATEKAWA, CC.No.16.251.923, para que en nombre y -----
representación de PROCAPS S.A.; endosen los títulos valores de la
sociedad hasta por la suma de UN MIL MILLONES DE PESOS -----
(1.000.000.000.00) M.L. CUARTO: El representante legal de la ----
sociedad PROCAPS S.A.; doctor RUBEN MINSKI GONTOVNIK, manifiesta
que la presente reforma fue aprobada por la Asamblea General ----
Extraordinaria de Accionista de PROCAPS S.A., con observancia de
las disposiciones legales y estatutarias.-----

C E R T I F I C A

Que por Escritura Pública No. 1,933 del 16 de Sep/bre de 2008,
otorgada en la Notaria 2 a. de Barranquilla cuya parte pertinente
se inscribió en esta Cámara de Comercio, el 06 de Octubre de 2008
bajo el No. 3,748 del libro respectivo,-----

***** C O N T I N U A *****

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O DE INSCRIPCION DE DOCUMENTOS.

PROCAPS S.A.

NIT: 890.106.527-5.

Consta que el señor RUBEN MINSKI GONTOVNIK, C.C. No. 7.463.982, que comparece en su condicion de Presidente y Representante Legal de la Sociedad PROCAPS S.A., confiere por medio de este instrumento publico Poder especial Amplio y Suficiente a la doctora MILENA ESCAFFI PARDO, C.C. No. 32.758.420, para que en nombre y representacion de PROCAPS S.A., suscriba declaraciones cambiarias, aduaneras y tributarias a que este obligada la sociedad en el giro normal de sus negocios y operaciones sociales, por tanto queda facultada para firmar, como tambien los demas documentos relacionados con ellas, notificarse, aportar y solicitar las pruebas que sean necesarias.

C E R T I F I C A

Que por Documento Privado del 09 de Abril de 2010, otorgado en Barranquilla inscrito en esta Cámara de Comercio, el 20 de Abril de 2010 bajo el Nro 4,201 del libro respectivo, Consta que el señor RUBEN MINSKI GONTOVNIK, C.C. No. 7.463.982, quien obra en el caracter de Presidente y/o Representante legal de la sociedad PROCAPS S.A., que por medio de este instrumento publico, otorga Poder Especial Amplio y Suficiente a la Doctora MONICA DE HART DE OCHOA, identificada con C.C. No. 32.676.025, para que en nombre y representacion de la sociedad, Endose las Facturas Nacionales e Internacionales hasta por la suma de UN MIL MILLONES DE PESOS (\$1.000.000.000.00) M.L. La doctora Monica de Hart de Ochoa, queda facultada para realizar todo acto o trámite necesario para el cabal cumplimiento del presente mandato.

C E R T I F I C A
DE BARRANQUILLA

Que por Documento Privado del 10 de Junio de 2010, otorgado en Barranquilla inscrito en esta Cámara de Comercio, el 13 de Julio de 2010 bajo el Nro 4,228 del libro respectivo, consta que el señor RUBEN MISNKI GONTOVNIK, cc. No. 7.463.982 en su condicion de Presidente y representante legal de PROCAPS S.A., confiere poder especial, amplio y suficiente al señor RICARDO DORADO HURTADO cc. No. 79.715.772 para que represente a la sociedad, ante el INVIMA, Fondo Nnacional de estupefacientes e ICA, con el fin que gestione, tramite o presente las diferentes solicitudes y peticiones de la empresa, segun la competencia de estas entidades. Por lo anterior, el Señor RICARDO DORADO HURTADO, queda facultado para presentar, gestionar, tramitar y firmar las diferentes solicitudes y peticiones de la empresa, segun la competencia de estas entidades, como tambien presentar y firmar todo los documentos relacionados con estas solicitudes, notificarse de cualquier acto administrativo que expidan, aportar y solicitar las pruebas que sean necesarias, desistir, y en general a realizar todo tramite o acto necesario de tal forma que la sociedad en ningun momento quede sin representacion legal ante estas entidades, en cumplimiento fiel al mandato otorgado.

C E R T I F I C A

***** C O N T I N U A *****



CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O DE INSCRIPCION DE DOCUMENTOS.
PROCAPS S.A.-----
NIT: 890.106.527-5.

Que por Documento Privado del 03 de Agosto de 2010, otorgado en Barranquilla inscrito en esta Cámara de Comercio, el 24 de Agosto de 2010 bajo el Nro 4,258 del libro respectivo,-----
consta que RUBEN MINSKI GONTOVNIK, varón, mayor de edad, de ésta vecindad, identificado con la cédula de ciudadanía No.7.463.982, expedida en Barranquilla, en mi condición de Representante legal y/o Presidente de la sociedad PROCAPS S. A., conforme a las -----
facultades otorgadas por los Estatutos Sociales, todo lo cual -----
demuestro con el certificado de existencia y representación legal expedido por la Cámara de Comercio de Barranquilla, que adjunto a este escrito, me permito manifestarles que confiero poder especial, amplio y suficiente al señor MARIO LÓPEZ LEON, varón, mayor de -----
edad, de esta vecindad, identificado con la cédula de ciudadanía No.72.311.558, expedida en Puerto Colombia (Atlántico), para que en nombre y representación de la sociedad, realice los siguientes -----
actos: 1. Endosar las Facturas Nacionales e Internacionales de esas compañías hasta por la suma de UN MIL MILLONES DE PESOS -----
(\$1.000.000.000.00) Moneda Legal. 2. Suscribir Declaraciones -----
Cambiarias, Aduaneras y Tributarias a las que esta obligada la -----
sociedad en el giro ordinario de sus negocios, quedando facultado para notificarse, aportar y solicitar pruebas relacionados con las declaraciones Cambiarias. El señor MARIO LÓPEZ LEÓN, queda -----
facultado para notificarse, aportar y solicitar pruebas, presentar escritos en caso que resulte necesario en general a realizar todo acto, diligencia o tramite que considere indispensable para el -----
cabal cumplimiento del presente mandato.-----

C E R T I F I C A

Que en esta Cámara de Comercio no aparecen inscripciones posteriores de documentos referentes a reforma, disolución, liquidación o nombramientos de representantes legales de la expresada sociedad.

C E R T I F I C A

Que su última Renovación fue el: 31 de Marzo de 2011.

La información sobre embargos de establecimiento se suministra en Certificados de Matrícula, la de contratos sujetos a registro, en Certificados Especiales.

C E R T I F I C A

Que los actos de registro aquí certificados quedan en firme cinco días hábiles despues de la correspondiente inscripción, siempre

OFIXPRES SAS NIT. 900.159.004-1

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O DE INSCRIPCION DE DOCUMENTOS.

PROCAPS S.A.

NIT: 890.106.527-5.

que, dentro de dicho término, no sean objeto de los recursos de reposición ante esta entidad, y/o de apelación para ante la Superintendencia de Industria y Comercio.

embajador



**CAMARA DE
COMERCIO
DE BARRANQUILLA**

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
19 July 2007 (19.07.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/081824 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 38/28 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2007/000320

(22) International Filing Date: 8 January 2007 (08.01.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/756,930 6 January 2006 (06.01.2006) US
60/757,364 9 January 2006 (09.01.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): CASE,
WESTERN RESERVE UNIVERSITY [US/US]; 10900
Euclid Avenue, Cleveland, OH 44106 (US).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): WEISS, Michael
[US/US]; 70 Woodburn Drive, Moreland Hills, OH 44022
(US).

(74) Agents: CUNNIFF, John J. et al.; One Gojo Plaza, Suite
360, Akron, OH 44311 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, LY, MA, MD, 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, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

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



WO 2007/081824 A2

(54) Title: FIBRILLATION RESISTANT PROTEINS

(57) Abstract: Protection of proteins against fibrillation may be afforded by introduction of certain histidine substitutions into the protein, such that a pair of histidines are present with sufficient spacing as to allow the histidines to coordinate with zinc. In the case of insulin, introduction of histidine residue substitutions at residues A4 and A8 together or a histidine residue substitution at residue B1, provides increased resistance to fibrillation while maintaining at least a majority of the activity of the insulin analogue. Introduction of a histidine residue substitution at residue A8 restores at least a portion of fibrillation resistance that may have been harmed by substitutions present on the B-chain such as those present in fast-acting insulins. Proteins protected by such histidine substitutions may be used to provide a pharmaceutical composition. A method of treating a patient includes administering a physiologically effective amount of the pharmaceutical composition to the patient.

Fibrillation Resistant Proteins

This application claims priority from US Provisional Patent Application Numbers 60/756,930 and 60/757,364 filed on 6 January 2006 and 9 January 2006, respectively.

This invention was made with government support under cooperative agreements awarded by the National Institutes of Health, Contract No. NIH RO1DK069764. The U.S. government may have certain rights to the invention.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The stability of proteins used in medical treatment is an important concern in medicine. Protein degradation can be classified as physical or chemical degradation. Chemical degradation of proteins can include deamination or transamination of the protein. Physical degradation may include a change in conformation that leads to aggregation of the protein and formation of protein fibrils. The present invention concerns the prevention of fibrillation.

Administration of the protein insulin has long been established as a treatment for diabetes. Insulin is a small globular protein that plays a central role in metabolism in vertebrates. Insulin contains two chains, an A chain, containing 21 residues and a B chain containing 30 residues. The hormone is stored in the pancreatic β -cell as a Zn^{2+} -stabilized hexamer, but functions as a Zn^{2+} -free monomer in the bloodstream. Insulin is the product of a single-chain precursor, proinsulin, in which a connecting region (35 residues) links the C-terminal residue of B chain (residue B30) to the N-terminal residue of the A chain (Fig. 1A). Although the structure of proinsulin has not been determined, a variety of evidence indicates that it consists of an insulin-like core and disordered connecting peptide (Fig. 1B). Formation of three specific disulfide bridges (A6-A11, A7-B7, and A20-B19; Fig. 1B) is thought to be coupled to oxidative folding of proinsulin in the rough endoplasmic reticulum (ER). Proinsulin assembles to form soluble Zn^{2+} -coordinated hexamers shortly after export from ER to the Golgi apparatus. Endoproteolytic digestion and conversion to insulin occurs in

immature secretory granules followed by morphological condensation. Crystalline arrays of zinc insulin hexamers within mature storage granules have been visualized by electron microscopy (EM). Assembly and disassembly of native oligomers is thus intrinsic to the pathway of insulin biosynthesis, storage, secretion, and action (Fig. 2).

Insulin readily misfolds *in vitro* to form a prototypical amyloid. Unrelated to native assembly, fibrillation is believed to occur via an amyloidogenic partial fold (Fig. 1C). Factors that accelerate or hinder fibrillation have been extensively investigated in relation to pharmaceutical formulations. Zinc-free insulin is susceptible to fibrillation under a broad range of conditions and is promoted by factors that impair native dimerization and higher order self-assembly. It is believed that the structure of active insulin is stabilized by axial zinc ions coordinated by the side chains of His^{B10}.

Amino-acid substitutions in the A- and/or B- chains of insulin have widely been investigated for possible favorable effects on the pharmacokinetics of insulin action following subcutaneous injection. Examples are known in the art of substitutions that accelerate or delay the time course of absorption. Such substitutions (such as Asp^{B28} in Novalog® and [Lys^{B28}, Pro^{B29}] in Humalog®) can be and often are associated with more rapid fibrillation and poorer physical stability. Indeed, a series of ten analogs of human insulin for susceptibility to fibrillation, including Asp^{B28}-insulin and Asp^{B10}-insulin have been tested. All ten were found to be more susceptible to fibrillation at pH 7.4 and 37 °C than is human insulin. The ten substitutions were located at diverse sites in the insulin molecule and are likely to be associated with a wide variation of changes in classical thermodynamic stability. These results suggest that substitutions that protect an insulin analogue from fibrillation under pharmaceutical conditions are rare; no structural criteria or rules are apparent for their design.

Fibrillation, which is a serious concern in the manufacture, storage and use of insulin and insulin analogues for diabetes treatment, is enhanced with higher temperature, lower pH, stirring or the presence of urea, guanidine, ethanol co-solvent, or hydrophobic surfaces.

Current US drug regulations demand that insulin be discarded if fibrillation occurs at a level of one percent or more. Because fibrillation is enhanced at higher temperatures, diabetic individuals optimally must keep insulin refrigerated prior to use. Fibrillation of insulin or insulin analogue can be a particular concern for diabetic patients utilizing an insulin pump, in which small amounts of insulin or insulin analogue are injected into the patient's body at regular intervals. In such a usage, the insulin or insulin analogue is not kept refrigerated within the pump apparatus and fibrillation of insulin can result in blockage of the catheter used to inject insulin or insulin analogue into the body, potentially resulting in unpredictable blood glucose level fluctuations or even dangerous hyperglycemia. At least one recent report has indicated that lispro insulin (an analogue in which residues B28 and B29 are interchanged relative to their positions in wild-type human insulin; trade name HumalogTM) may be particularly susceptible to fibrillation and resulting obstruction of insulin pump catheters.

Insulin fibrillation is an even greater concern in implantable insulin pumps, where the insulin would be contained within the implant for 1-3 months at high concentration and at physiological temperature (i.e. 37 °C), rather than at ambient temperature as with an external pump. Additionally, the agitation caused by normal movement would also tend to accelerate fibrillation of insulin. In spite of the increased potential for insulin fibrillation, implantable insulin pumps are still the subject of research efforts, due to the potential advantages of such systems. These advantages include intraperitoneal delivery of insulin to the portal circulatory system, which mimics normal physiological delivery of insulin more closely than subcutaneous injection, which provides insulin to the patient via the systemic circulatory system. Intraperitoneal delivery provides more rapid and consistent absorption of insulin compared to subcutaneous injection, which can provide variable absorption and degradation from one injection site to another. Administration of insulin via an implantable pump also potentially provides increased patient convenience. Whereas efforts to prevent fibrillation, such as by addition of a surfactant to the reservoir, have provided some improvement, these improvements have heretofore been considered insufficient to allow reliable usage of an implanted insulin pump in diabetic patients outside of strictly monitored clinical trials.

Resistance to fibrillation caused by heat or other causes would be advantageous not only for insulin and insulin analogs, but for a variety of medically useful proteins, especially in tropical and sub-tropical regions of the developing world. The major barrier to the storage and practical use of presently available pharmaceutical formulations of insulin and insulin analogues at temperatures above 30 °C is due to accelerated fibrillation of the protein. The major reason for limitations to the shelf life of presently available pharmaceutical formulations of insulin and insulin analogues at temperatures above 10 °C is due to fibrillation of the protein. Fibrillation is of special concern for fast-acting or "mealtime" insulin analogues (such as HumalogTM and NovalogTM) when these formulations are diluted by the patient and stored at room temperature for more than 15 days.

Modifications of proteins such as insulin are known to increase resistance to fibrillation but impair biological activity. For example, "mini-proinsulin," a proinsulin analogue containing a dipeptide linker between the A and B chains of insulin, is resistant to fibrillation but is impaired in its activity. Therefore, a need exists for insulin analogues and other protein analogues that are resistant to fibrillation and that maintain at least a majority of their biological activity.

SUMMARY OF THE INVENTION

It is, therefore, an aspect of the present invention to provide protein analogues that are more resistant to fibrillation than their wild-type counterparts, while maintaining biological activity.

It is another aspect of the present invention to provide insulin analogues that are more resistant to fibrillation than their counterpart insulins but maintain at least a majority of their biological activity.

It is still another aspect of the present invention to provide an insulin A- or B chain

analogue that, as a part of an insulin analogue, provides increased resistance to fibrillation compared to the non-analogue counterpart insulin.

It is still another aspect of the present invention to provide amino-acid substitutions in the insulin A- or B chains such that, as a part of an unrelated insulin analogue with enhanced susceptibility to fibrillation, the substitutions described herein at least partially compensate for the instability of the original analogue to provide increased resistance to fibrillation relative to non-substituted counterpart analogue.

It is yet another aspect of the present invention to provide a nucleic acid that encodes for at least a portion of an insulin analogue that displays increased resistance to fibrillation compared to a non-analogue insulin.

In general, the present invention provides a vertebrate insulin analogue or a physiologically acceptable salt thereof, comprising at least one of the following substitutions: histidine residue substitutions at residues A4 and A8 together, and a histidine residue substitution at residue B1. In one example, the vertebrate insulin analogue is a mammalian insulin analogue, such as a human, porcine, bovine or equine insulin analogue. The histidine substitutions specified above may be used in combination with each other (A4, A8 and B1 tri-substitutions); the B1 or paired A4-A8 histidine substitutions may also be combined with unrelated substitutions elsewhere in the insulin molecule intended to introduce other favorable pharmaceutical properties unrelated to resistance to fibrillation.

Additionally, in some embodiments, the present invention provides an insulin analogue with an increased resistance to fibrillation over its counterpart analogues. Known insulin analogs (such as HumalogTM and NovalogTM) have an increased susceptibility to fibrillation. The present invention also specifies the use of histidine (i) singly at position B1, (ii) singly at position A8, (iii) at A8 in combination with histidine also at A4, or (iv) jointly at positions B1, A4, and A8 to compensate for the instability of insulin analogues containing amino-acid

22

substitutions in the B-chain (such as but not restricted to substitutions at position B28 and/or position B29) for the purpose of augmenting their resistance to fibrillation.

The present invention likewise provides a pharmaceutical composition comprising such insulin analogues and which may additionally include zinc ions. Optimally, in the presence of phosphate-containing buffers, zinc ions may be included in such a composition at a level of a molar ratio of between 2.2 and 3.0 per hexamer of the insulin analogue; in the presence of buffers based on Tris Hydroxymethylaminoethane (Tris), or other buffers that, like Tris, do not bind well to zinc ions to form an insoluble salt, zinc ions may be included in such a composition at a level of a molar ratio of between 2.2 and 5.0 per hexamer of the insulin analogue. In such a formulation the concentration of the insulin analogue would typically be between 0.1 and 1.5 mM. Excipients may include glycerol, glycine, other buffers and salts, and anti-microbial preservatives such as phenol and meta-cresol; the latter preservatives are known to enhance the stability of the insulin hexamer. Such a pharmaceutical composition may be used to treat a patient having diabetes or other medical condition by administering a physiologically effective amount of the composition to the patient.

The present invention also provides a nucleic acid comprising a sequence that encodes a polypeptide selected from the group consisting of an A chain insulin analogue containing histidine residue substitutions at residues A4 and A8, a B chain insulin analogue containing a histidine residue substitution at residue B1, and combinations thereof. The nucleic acid sequence may encode either the isolated A- and B chain analogue, a modified A- or B chain containing an unrelated substitution or extension elsewhere in the polypeptide, modified proinsulin analogues, or single-chain insulin analogues containing a modified or foreshortened connecting domain. The nucleic acid may also be a portion of an expression vector, and that vector may be inserted into a host cell such as a prokaryotic host cell like an *E. coli* cell line, or a eukaryotic cell line such as *S. cerevisiae* or *Pischia Pastoris* strain or cell line.

The present invention likewise provides a method of increasing the resistance of polypeptides to fibrillation. The method includes introducing a histidine substitution or two paired histidine substitutions into the polypeptide such that a pair of histidines are present in the polypeptide with sufficient spacing between the pair of histidines as to allow the side chains of the histidines to coordinate with zinc. In one example, there are three intervening amino acids between the pair of histidines. In another example, the pair of histidines are present in an α -helix of the polypeptide. It is envisioned that the method would also work with a spacing of two intervening amino acids between the histidines. The method may be utilized to introduce one or more histidine substitutions into the A or B chain of a vertebrate insulin to increase the resistance of the resulting insulin to fibrillation. Irrespective of theory, the method may also utilize a histidine substitution in one chain of insulin to compensate for enhanced susceptibility to fibrillation caused by substitutions in the other chain. For example, Histidine substitutions at A8 alone or at A4 and A8 together may compensate for enhanced susceptibility to fibrillation caused by substitutions or other changes in the B-chain.

Chemical degradation of insulin, such as deamination, isopeptide bond formation, and disulfide interchange leading to formation of covalent polymers, is known to be reduced by formulations or modifications that enhance the thermodynamic stability of the native molecular structure of the insulin or insulin analogue. While not wishing to be bound by theory, introduction of a pair of histidine residues on the surface of a protein may confer a zinc-dependent increase in thermodynamic stability and so delay chemical degradation of the protein.

It is still another aspect of the present invention to provide a method treating a patient comprising administering a fibrillation-resistant insulin analogue to the patient. In one example, the fibrillation-resistant insulin analogue is a single-chain insulin analogue. In another example, the insulin is administered by an external or implantable insulin pump.

BRIEF DESCRIPTION OF THE SEVERAL VIEWS OF THE DRAWINGS

FIG. 1A is a schematic representation of the sequence of human proinsulin including the A and B chains and the connecting region shown with flanking dibasic cleavage sites (filled circles) and C-peptide (open circles). The line labeled "foreshortened connecting peptide" represents the connecting region in mini-proinsulin, which is a proinsulin analogue containing a dipeptide (Ala-Lys) linker between the A chain and B chain portions of insulin.

Fig. 1B provides a structural model of proinsulin, consisting of an insulin-like moiety and disordered connecting peptide (dashed line). The asterisk indicates the location of a foreshortened AK linker in mini-proinsulin.

Fig. 1C provides a representation of a proposed pathway of insulin fibrillation via partial unfolding of monomer. The native state is protected by classic self-assembly (far left). Disassembly leads to equilibrium between native- and partially folded monomers (open triangle and trapezoid, respectively). This partial fold may unfold completely as an off-pathway event (open circle) or aggregate to form a nucleus en route to a protofilament (far right).

Fig. 2 is a representation of the pathway of insulin biosynthesis, storage, and secretion. A, nascent proinsulin folds as a monomer in ER wherein zinc-ion concentration is low; in Golgi apparatus zinc-stabilized proinsulin hexamer assembles, which is processed by cleavage of connecting peptide to yield mature insulin. Zinc-insulin crystals are observed in secretory granules. B, on metabolic stimulus, zinc-insulin crystals are released into portal circulation (pink) and disassociate in steps to liberate the functional monomer.

Fig. 3A is a representation of a variant $T_3R_3^f$ zinc hexamer. The side chains of His^{A4, A8} and His^{B10} in a Zn^{2+} -coordination site are shown.

Fig. 3B is a ribbon representation of a crystal structure of a His^{A4, A8} insulin dimer.

Ribbon representation of crystal structure of His^{A4,A8}-insulin. The A-chain of molecule 1 and 2 are shown in black and B-chain and B-chain N-terminal (B1-B8) α -helix in gray, residues of His^{A4,A8} side chains are shown in black stick, and a Zn²⁺-coordination site is noted.

Fig. 3C is a representation of a crystal structure of His^{A4,A8} insulin monomer.

Fig. 3D is a space-filling representation of T-state promoter showing His^{A4,A8} relation to classical the surface. The side chains of His^{A4,A8} are shown in black with a Zn²⁺-coordination site between the two His residues.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention is directed toward recombinant proteins that provide increased resistance to fibrillation. Particularly, the present invention provides insulin analogues that are resistant to fibrillation. To that end, the present invention provides insulin analogues that contain histidine (His) residue substitutions at positions A8, A4 and A8, or at B1. The insulin analogues of the present invention may include insulin analogues containing His substitutions at all three of the positions A4, A8, and B1. In one particular example, an insulin analogue of the present invention contains only a His substitution at position B1.

While not wishing to be bound by theory, it is believed that when the His^{B1} substitution is present, the side chain of the B1 His residue, in combination with the B5 histidine side chain, provides a potential B1-B5 bi-histidine Zn-binding site, which confers Zn-dependent protection from fibrillation. Similarly, while not wishing to be bound by theory, it is believed that the [His^{A4}, His^{A8}] substitutions also provide a potential bi-histidine Zn-binding site, which confers protection from fibrillation. It is further envisioned that zinc stabilization of insulin will not affect activity in vivo because such zinc-protein structures are predicted to dissociate at protein and zinc concentrations less than about 1 μ M. The protective effect of zinc binding may be mediated either through binding to the native molecular structure or to a distorted molecular structure as is thought to occur as an intermediate in the process of

fibrillation.

Additionally, while not wishing to be bound by theory, it is believed that when the His^{A8} substitution is present in the presence or absence of zinc and irrespective of histidines substitutions at B1 and/or A4, insulin analogues containing otherwise fibrillation-enhancing amino acid substitutions in the B-chain will regain at least some resistance to fibrillation compared to the corresponding insulin analogue containing only the fibrillation enhancing B-chain substitution or substitutions.

As used in this specification and the claims, various analogues may be noted by the amino acid being substituted, followed by the position of the amino acid, optionally in superscript. The position of the amino acid in question includes the A or B chain of insulin where the substitution is located. Thus, His^{B1} denotes a histidine substitution at the first amino acid of the B chain of insulin. His^{A4} denotes a histidine substitution at the fourth amino acid of the A chain of insulin, and His^{A8} denotes a histidine substitution at the eighth amino acid of the A chain of insulin. Unless noted otherwise or wherever obvious from the context, the amino acids noted herein should be considered to be L-amino acids.

It is envisioned that the substitutions of the present invention may be made in any of a number of existing insulin analogues. For example, the His^{A8}, [His^{A4}, His^{A8}], or His^{B1} substitutions, or combinations thereof, may be made in insulin analogues such as Lispro insulin (HumalogTM), insulin Aspart (NovologTM), other modified insulins or insulin analogues, or within various pharmaceutical formulations, such as regular insulin, NPH insulin, lente insulin or ultralente insulin, in addition to human insulin. These substitutions may also be introduced into analogues of human insulin that, while not clinically used, are still useful experimentally, such as DKP-insulin, which contains the substitutions Asp^{B10} (D), Lys^{B28} (K) and Pro^{B29} (P), or miniproinsulin, a proinsulin analogue containing a dipeptide (Ala-Lys) linker between the A chain and B chain portions of insulin in place of the normal 35 amino acid connecting region between the C-terminal residue of the B chain and the N-

terminal residue of the A chain.

The present invention is not limited to human insulin and its analogues however. It is also envisioned that these substitutions may also be made in animal insulins such as porcine, bovine, equine, and canine insulins, by way of non-limiting examples.

Furthermore, in view of the similarity between human and animal insulins, and use in the past of animal insulins in human diabetic patients, it is also envisioned that other minor modifications in the sequence of insulin may be introduced, especially those substitutions considered "conservative" substitutions. For example, additional substitutions of amino acids may be made within groups of amino acids with similar side chains, without departing from the present invention. These include the neutral hydrophobic amino acids: Alanine (Ala or A), Valine (Val or V), Leucine (Leu or L), Isoleucine (Ile or I), Proline (Pro or P), Tryptophan (Trp or W), Phenylalanine (Phe or F) and Methionine (Met or M). Likewise, the neutral polar amino acids may be substituted for each other within their group of Glycine (Gly or G), Serine (Ser or S), Threonine (Thr or T), Tyrosine (Tyr or Y), Cysteine (Cys or C), Glutamine (Glu or Q), and Asparagine (Asn or N). Basic amino acids are considered to include Lysine (Lys or K), Arginine (Arg or R) and Histidine (His or H). Acidic amino acids are Aspartic acid (Asp or D) and Glutamic acid (Glu or E). In one example, the insulin analogue of the present invention contains three or fewer conservative substitutions other than the [His^{A4}, His^{A8}], or His^{B1} substitutions of the present invention. In another example, the insulin analogue of the present invention contains one or fewer conservative substitutions other than the His^{A8}, [His^{A4}, His^{A8}], or His^{B1} substitutions of the present invention.

The amino-acid sequence of the A chain of human insulin is provided, for comparative purposes, as SEQ. ID. NO. 1. The amino acid sequence of an analogue of the A chain of human insulin containing the His^{A4} and His^{A8} substitutions is provided as SEQ. ID. No. 2. The amino acid sequence of the B chain of human insulin is provided, for comparative purposes, as SEQ. ID. NO. 3. The amino acid sequence of an analogue of the B chain of

human insulin containing the His^{B1} substitution is provided as SEQ. ID. NO. 4. Further combinations of other substitutions are also within the scope of the present invention. It is also envisioned that the substitutions of the present invention may also be combined with substitutions of prior known insulin analogues. For example, the amino acid sequence of an analogue of the B chain of human insulin containing the Lys^{B28} Pro^{B29} substitutions of lispro insulin combined with the His^{B1} substitution is provided as SEQ. ID. NO. 5. Likewise, the amino acid sequence of an analogue of the B chain of human insulin containing the Asp^{B28} substitution of aspart insulin, combined with the His^{B1} substitutions, is provided as SEQ. ID. NO. 6.

By way of example and not of limitation, it is also envisioned that the [His^{A4}, His^{A8}], and/or His^{B1} substitutions of the present invention may also be made in an insulin analogue or proinsulin analogue having the amino acid sequence represented by formula I,

R1-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-
Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-R2-R3-Thr- Xaa₀₋₃₅- Gly-Ile-
Val-R4-Gln-Cys-Cys-R5-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-
Cys-Asn;

(I)

wherein R1 is His or Phe; wherein R2 is Pro, Lys, or Asp; wherein R3 is Lys or Pro; wherein R4 is His or Glu; wherein R5 is His or Thr; and wherein Xaa₀₋₃₅ is 0-35 of any amino acid or a break in the amino acid chain;

and further wherein at least one substitution selected from the group of the following amino acid substitutions is present:

R1 is His; and

R5 is His; and

R4 and R5 together are His.

Analogues of insulin containing the His^{B1}, His^{A8}, or the [His^{A4}, His^{A8}] substitutions were made in human insulin and DKP insulin as follows. The tetra-S-sulfonate derivative of the A

chain was obtained by oxidative sulfitolysis of human insulin (provided by Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN) followed by separation of the S-sulphonated A and B chains as known in the art. A and B-chain analogues were prepared by solid-phase chemical synthesis. 4-methylbenzhydrylamine resin (0.6 mmol of amine/g; Bachem, Inc.) was used as solid support for synthesis of A-chain analogues; (N-*tert*-butoxycarbonyl, O-benzyl)-threonine-PAM resin (0.56 mmol/g; Bachem, Inc.) was used as solid support for synthesis of B-chain analogues. A manual double-coupling protocol was followed. Insulin analogues were prepared by chain combination in 0.1M glycine buffer (pH 10.6) in the presence of 4.5 mM dithiothreitol (DTT). Analogues were purified by size exclusion chromatography (Bio-Gel P-4 in 3M acetic acid) and preparative reverse phase HPLC. Predicted molecular masses were confirmed by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS).

The following analogues were synthesized and tested for activity and resistance to fibrillation as provided herein in comparison to human insulin and otherwise unmodified DKP-insulin. An A-chain analogue having the sequence of SEQ. ID. NO. 2 was combined with a B chain peptide having the sequence of SEQ. ID. NO. 3 to provide a [His^{A4}, His^{A8}]-insulin analogue. A [His^{A4}, His^{A8}]-DKP-insulin analogue was prepared with the peptides identified by SEQ. ID. NOS. 2 and 7. A His^{B1}-insulin analogue was prepared with peptides having the sequences of SEQ. ID. NOS. 1 and 4. A His^{B1}-DKP-insulin analogue was prepared with the peptides identified by SEQ. ID. NOS. 1 and 8. A His^{A8}-DKP-insulin analogue was prepared with the peptides identified by SEQ. ID. NOS. 9 and 7. The rationale of testing of substitutions in the context of a monomeric analog is that the insulin monomer is thought to be an obligatory intermediate in the molecular pathway of fibrillation; protective effects in the context of a zinc insulin hexamer would be expected to be similar or greater. In addition, the crystal structure of an insulin analogue containing the paired substitutions [His^{A4}, His^{A8}] was determined in the presence of zinc ions to verify the formation of a novel zinc-ion-binding site involving the introduced histidines side chains at these positions.

Receptor-Binding Assays. Relative activity is defined as the ratio of analogue to wild-

type human insulin required to displace 50 percent of specifically bound ^{125}I -human insulin. A human placental membrane preparation containing the insulin receptor (IR) was employed as known in the art. Membrane fragments (0.025 mg protein/tube) were incubated with ^{125}I -labeled insulin (ca. 30,000 cpm) in the presence of selected concentrations of unlabelled analogue for 18 hours at 4°C in a final volume of 0.25 ml of 0.05 M Tris-HCl and 0.25 percent (w/v) bovine serum albumin at pH 8. Subsequent to incubation, mixtures are diluted with 1 ml of ice-cold buffer and centrifuged (10,000g) for 5 min at 4°C. The supernatant will then be removed by aspiration, and the membrane pellet counted for radioactivity. Data is corrected for nonspecific binding (amount of radioactivity remaining membrane associated in the presence of 1 μM human insulin. In all assays the percentage of tracer bound in the absence of competing ligand was less than 15% to avoid ligand-depletion artifacts. A corresponding microtiter plate antibody assay using the IGF Type I receptor was employed to assess cross-binding to this homologous receptor.

X-Ray Crystallography. Crystals of an analogue of human insulin containing histidines at positions A4 and A8 were grown by hanging-drop vapor diffusion in the presence of a 1:1.7 ratio of Zn^{2+} to protein monomer and a 3.5:1 ratio of phenol to protein monomer in Tris-HCl buffer as known in the art. Drops consisted of 1 μl of protein solution (8 mg/ml in 0.02 M HCl) mixed with 1 μl of reservoir solution (0.38 M Tris-HCl, 0.1 M sodium citrate, 9% acetone, 4.83 mM phenol, and 0.8mM zinc acetate at pH 8.4). Each drop was suspended over 1 ml of reservoir solution. Crystals (space group R3) were obtained at room temperature after two weeks. Data were collected from single crystals mounted in a rayon loop and flash frozen to 100° K. Reflections from 32.05-1.90 Å were measured with a CCD detector system on synchrotron radiation in Berkeley National Laboratory. Data were processed with programs DTREK. The crystal belongs to space group R3 with unit cell parameters: $a=b=78.09$ Å, $c=36.40$ Å, $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$. The structure was determined by molecular replacement using the computer program CNS. Accordingly, a model was obtained using the native TR dimer (Protein Databank (PDB) identifier 1RWE following removal of all water molecules, zinc- and chloride ions). A translation-function search was performed using coordinates from the

best solution for the rotation function following analysis of data between 15.0 and 4.0 Å resolutions. Rigid-body refinement using CNS, employing overall anisotropic temperature factors and bulk-solvent correction, yielded values of 0.325 and 0.344 for R and R_{free} , respectively, for data between 19.2 and 3.0 Å resolution. Between refinement cycles, $2F_o - F_c$ and $F_o - F_c$ maps were calculated using data to 3.0 Å resolution; zinc and chloride ions and phenol molecules were built into the structure using the program *O*. Water molecules were calculated and checked using DDQ program. The geometry was continually monitored with *PROCHECK*; zinc ions and water molecules were built into the difference map as the refinement proceeded. Calculation of omit maps (especially in the first eight residues of B chain N terminus of each monomer) and further refinement were carried out using CNS, which implement maximum-likelihood torsion-angle dynamics and conjugate-gradient refinement.

The crystal structure of [His^{A4}, His^{A8}]-insulin as a T₃R₃^f zinc hexamer (Fig. 3A), determined to a resolution of 1.9 Å, contains five bound zinc ions instead of the two bound zinc ions that are ordinarily observed in wild-type crystal structures obtained under these conditions. Three novel zinc ions are observed coordinated by the side chains of histidines side chains at positions A4 and A8 in the three T-state protomers in addition to the two classical axial zinc ions coordinated by the wild-type histidine side chain at position B10.

Activities of the insulin analogues [His^{A4}, His^{A8}]-insulin, [His^{A4}, His^{A8}]-DKP-insulin, His^{B1}-insulin, His^{B1}-DKP-insulin, and His^{A8}-DKP-insulin relative to human insulin, whose affinity is 0.05 nM under assay conditions are provided in Table 1. For comparison purposes, the activity of DKP-insulin is also provided. Histidine substitutions at positions B1, A4, A8, or jointly at positions A4 and A8, do not significantly enhance cross-binding of these analogues to the IGF-I Type I receptor; any such increase is less than twofold (i.e., the level of increased cross-binding exhibited by HumalogTM).

TABLE I

Affinity of Insulin and Insulin Analogues to Insulin Receptor

Sample:	Affinity (relative to human insulin):
Human insulin	100%
DKP-insulin	161 ± 19
His ^{A8} -DKP-insulin	167 ± 21
[His ^{A4} , His ^{A8}]-insulin	108 ± 4
[His ^{A4} , His ^{A8}]-DKP-insulin	201 ± 14
His ^{B1} -insulin	> 180
His ^{B1} -DKP-insulin	311 ± 48

These data indicate that the affinity of the analogues to the human insulin receptor is as great or greater than that of wild-type human insulin.

Circular Dichroism - Samples were dissolved in either 10 mM phosphate and 100 mM KCl (pH 7.4) or 0.01 N HCl (pH 2.0) at a protein concentration of 25 μ M. To remove particulate matter and protein aggregates, samples were filtered (0.22 μ M; Satorius, Goettingen, Germany). Spectra, acquired with an Aviv spectropolarimeter (Aviv Biomedical, Inc., Lakewood, NJ), were normalized. Data were obtained at 4 °C and fitted by non-linear least squares to a two-state model. CD Spectra for analogues were similar to native and DKP insulins (data not shown).

Fibrillation Assay - DKP-insulin and analogues were made 100 μ M in a deoxygenated buffer consisting of 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 140 mM NaCl, with or without 1 mM ZnCl₂. Samples (in triplicate) were placed in sealed glass vials and placed on an automated tilting table at 37 °C. At successive times aliquots were withdrawn and analyzed by a thioflavin T (ThT) fluorescence assay to determine the onset of fibrillation.

Fluorescence Spectroscopy—Thioflavin T (ThT) was made 1 mM in double-distilled water and stored at 4 °C in the dark. To monitor fibrillation, 10-μl aliquots obtained at indicated time points were mixed with 3 ml of ThT assay buffer (5 μM ThT in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 100 mM NaCl). Fluorescence measurements were performed using an Aviv spectrofluorometer in 1-cm quartz cuvettes. Emission spectra were collected from 470 to 500 nm following excitation at 450 nm; the integration time was 1 s. ThT in buffer without protein was used as baseline. The fibrillation lag time is defined as the time required to observe 2-fold enhancement in ThT emission. The threshold of 2-fold-enhanced ThT fluorescence is followed a rapid increase in turbidity associated with elongation of mature fibrils and a further increase in ThT fluorescence. Under these conditions, human insulin undergoes fibrillation in 3-4 days in the absence of zinc. Lag times prior to fibrillation of the analogues are provided in Table II.

TABLE II
Fibrillation Lag Times of DKP-insulin and analogues ± Zinc

Sample (without Zn)	Lag time (days)	Sample (with Zn)	Lag time (days)
DKP-insulin	7.7 ± 0.6	DKP-insulin	11.7 ± 2.5
[His ^{A4} , His ^{A8}]-DKP-insulin	22.7 ± 1.5	[His ^{A4} , His ^{A8}]-DKP-insulin	>92
His ^{B1} -DKP-insulin	6.8 ± 0.8	His ^{B1} -DKP-insulin	20.3 ± 2.1
His ^{A8} -DKP-insulin	21.3 ± 1.2	His ^{A8} -DKP-insulin	34 ± 1.7

In the presence of zinc, each of the DKP analogues provides a greater fibrillation lag time than DKP insulin. The protective effect against fibrillation was especially pronounced for the DKP-insulin analogue carrying the His^{A4}, His^{A8} substitutions in zinc. In the absence of zinc ions in a buffer consisting of 10 mM potassium phosphate and 140 mM KCl at pH 7.4 a single histidines substitution at position A8 increased the lag time prior to fibrillation from 3.5 ± 0.9 days to 13 ± 2.6 days at 37 °C.

Based upon the foregoing disclosure, it should now be apparent that the polypeptide analogues provided herein will provide increased resistance to fibrillation while maintaining at least the majority of the activity of the polypeptide. The histidine substitutions specified herein may be employed to enhance the resistance of wild-type human insulin or to compensate for otherwise destabilizing effects of unrelated substitutions in the A- or B-chains. It is, therefore, to be understood that any variations evident fall within the scope of the claimed invention and thus, the selection of specific component elements can be determined without departing from the spirit of the invention herein disclosed and described.

CLAIMS

We claim:

1. A vertebrate insulin analogue or a physiologically acceptable salt thereof, comprising at least one of:

histidine residue substitutions at residues A4 and A8 together; and
a histidine residue substitution at residue B1.

2. The vertebrate insulin analogue or a physiologically acceptable salt thereof of claim 1, comprising a mammalian insulin analogue or a physiologically acceptable salt thereof.

3. The mammalian insulin analogue or a physiologically acceptable salt thereof of claim 2, comprising an insulin analogue selected from the group consisting of human, porcine, bovine or equine insulin analogues, and analogues thereof that additionally contain three or fewer additional conservative amino acid substitutions, and physiologically acceptable salts thereof.

4. The mammalian insulin analogue or a physiologically acceptable salt thereof of claim 2, comprising SEQ. ID. NO. 2.

5. The mammalian insulin analogue or a physiologically acceptable salt thereof of claim 2, comprising SEQ. ID. NO. 10.

6. The mammalian insulin analogue or a physiologically acceptable salt thereof of claim 5, additionally comprising the SEQ. ID. NO. 2.

7. The mammalian insulin analogue or a physiologically acceptable salt thereof of

claim 2, wherein the A chain has a sequence of SEQ ID NO 2.

8. The mammalian insulin analogue or a physiologically acceptable salt thereof of claim 4, wherein the B chain has a sequence selected from the group consisting of SEQ. ID. NOS. 3-9.

9. A nucleic acid comprising a sequence that encodes a polypeptide selected from the group consisting of an A chain insulin analogue containing histidine residue substitutions at residues A4 and A8, a B chain insulin analogue containing a histidine residue substitution at residue B1, and combinations thereof.

10. The nucleic acid of claim 9, additionally comprising a nucleic acid sequence encoding between 0 and about 34 amino acids between the A chain insulin sequence and the B chain insulin sequence.

11. A polypeptide comprising an insulin analogue or proinsulin analogue having the amino acid sequence represented by formula I,

R1-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-
Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-R2-R3-Thr- Xaa₀₋₃₅- Gly-Ile-
Val-R4-Gln-Cys-Cys-R5-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-
Cys-Asn;

(I)

wherein R1 is His or Phe; wherein R2 is Pro, Lys, or Asp; wherein R3 is Lys or Pro; wherein R4 is His or Glu; wherein R5 is His or Thr; and wherein Xaa₀₋₃₅ is 0-35 of any amino acid or a break in the amino acid chain;

and further wherein at least one substitution selected from the group of the following amino acid substitutions is present:

R1 is His; and
R5 is His; and
R4 and R5 together are His.

12. The polypeptide of claim 11 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS. 2, and 4-9.
13. An expression vector comprising the nucleic acid sequence of claim 9.
14. A host cell transformed with the expression vector of claim 13.
15. A pharmaceutical composition comprising an insulin analogue or a physiologically acceptable salt thereof according to any of claims 1-8.
16. The pharmaceutical composition of claim 15 additionally comprising zinc.
17. The pharmaceutical composition of claim 16, comprising about 2.2 to about 3.0 moles of zinc per mole of insulin analogue or physiologically acceptable salt thereof.
18. A method of treating a patient comprising administering a physiologically effective amount of the pharmaceutical composition of claim 15.
19. A method of increasing the resistance of a polypeptide to fibrillation, the method comprising introducing at least one histidine substitution into the polypeptide such that a pair of histidines are present in the polypeptide with sufficient spacing as to allow the side chains of the pair of histidines to coordinate with zinc.

20. The method of claim 19, wherein the pair of histidines are present in an α -helix of the polypeptide.

21. The method of claim 19, wherein there are three intervening amino acids providing the spacing between the pair of histidines.

22. The method of claim 19, wherein the polypeptide is selected from the group consisting of the A chain of a vertebrate insulin and a B chain of a vertebrate insulin.

23. The method of claim 22 wherein the vertebrate insulin is human insulin.

24. A vertebrate insulin analogue comprising SEQ. ID. NO. 9 and additionally comprising a substitution of the B-chain selected from the group consisting of mutations at B28 and mutations at B29.