



No. 10-079133- -00004-0000

Fecha: 2011-11-17 12:56:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 400 OPOSIOBSERVTER Folios: 39

Industria y Comercio

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

Número del expediente: 10 - 079,133

Solicitante: SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH

SOLICITUD
PUBLICADA

ApoDERADO: LUIS PATIÑO LEYVA

Título de la nueva creación o denominación del signo: ANALOGOS DE INSULINA EN LOS
 CUALES EL EXTREMO DE LA CADENA B CONSISTE EN UN RESIDUO AMINOACIDO, EL RESIDUO DE AMINOACIDO N-TERMINAL DE LA
 CADENA A DE LA INSULINA ES UN RESIDUO LISINA O ARGININA, LA POSICION A8 DEL AMINOACIDO ESTÁ OCUPADA POR UN RESIDUO
 HISTIDINA, LA POSICION A21 DEL AMINOACIDO ESTÁ OCUPADA POR UN RESIDUO GLICINA, Y SE EFECTÚAN UNA O MÁS SUSTITUCIONES
 Y/O ADICIONES DE RESIDUOS AMINOACIDOS NEGATIVAMENTE CARGADOS EN LAS POSICIONES A5, A15, A18, B-1, B0, B1, B2, B3 Y B4"

631

③ OPOSICION PRESENTADA POR:

SOLICITANTE	Nombre: PROCAPS S.A.	IDENTIFICACIÓN	
	Dirección: CALLE 80 No. 78b-201	C.C. ☐	NIT ☒
	Nacionalidad o Domicilio: COLOMBIA	C.E. ☐	Otro ☐
	Lugar de Constitución: BARRANQUILLA	Cual	
	Teléfono: 371 99 00 Fax: 373 0815	Número 890.106.527-5	
	E-mail:		
REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: ELIANA ISAURA MORENO BOHORQUEZ	IDENTIFICACIÓN	
	Dirección: CARRERA 104 N°119-95 OF 104	C.C. ☒	NIT ☐
	Teléfono: 2131213 Fax: 6121979	C.E. ☐	Otro ☐
	E-mail: negocios@optimum-co.com	Cual	
		Número 51.975.664 TP 83823	

④ FUNDAMENTOS DE LA OPOSICION:

Art.14, 16, 18, 20 y 30 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.

101112101

Fecha

2/11/2011

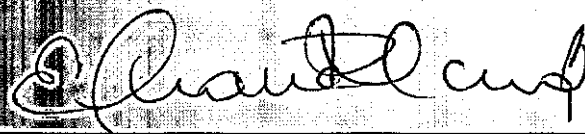
⑥ ANEXOS

- ☒ 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

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 112101

Bogotá D.C., Noviembre 17 de 2011 - 12:26:37

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	389345084	28/10/2011	912.000.00

***** Conceptos Pagados *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	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: **TRESCIENTOS CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-079133- -00004-0000

Fecha: 2011-11-17 12:56:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Evs: 378 FASENACIONALI
Act. 400 OPOSIOBSERVTER Folios: 39

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

, Noviembre 17 de 2011 - 12:26:38



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 79133

Asunto : Oposición a la solicitud de patente de Invención titulada
"ANALOGOS DE INSULINA EN LOS CUALES EL EXTREMO DE LA CADENA B CONSISTE EN UN RESIDUO AMINOÁCIDO, EL RESIDUO DE AMINOÁCIDO N-TERMINAL DE LA CADENA A DE LA INSULINA ES UN RESIDUO LISINA O ARGININA, LA POSICIÓN A8 DEL AMINOÁCIDO ESTÁ OCUPADA POR UN RESIDUO HISTIDINA, LA POSICIÓN A21 DEL AMINOÁCIDO ESTÁ OCUPADA POR UN RESIDUO GLICINA, Y SE EFECTÚAN UNA O MÁS SUSTITUCIONES Y/O ADICIONES DE RESIDUOS AMINOÁCIDOS NEGATIVAMENTE CARGADOS EN LAS POSICIONES A5, A15, A18, B-1, B0, B1, B2, B3 Y B4"

Solicitante : SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH

Opositora : PROCAPS S.A.

Publicada en la Gaceta de la Propiedad Industrial

N° 631 del 22 de agosto 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 *"ANALOGOS DE INSULINA EN LOS CUALES EL EXTREMO DE LA CADENA B CONSISTE EN UN RESIDUO AMINOÁCIDO, EL RESIDUO DE*



AMINOÁCIDO N-TERMINAL DE LA CADENA A DE LA INSULINA ES UN RESIDUO LISINA O ARGININA, LA POSICIÓN A8 DEL AMINOÁCIDO ESTÁ OCUPADA POR UN RESIDUO HISTIDINA, LA POSICIÓN A21 DEL AMINOÁCIDO ESTÁ OCUPADA POR UN RESIDUO GLICINA, Y SE EFECTÚAN UNA O MÁS SUSTITUCIONES Y/O ADICIONES DE RESIDUOS AMINOÁCIDOS NEGATIVAMENTE CARGADOS EN LAS POSICIONES A5, A15, A18, B-1, B0, B1, B2, B3 Y B4", 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 ANALOGOS DE 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

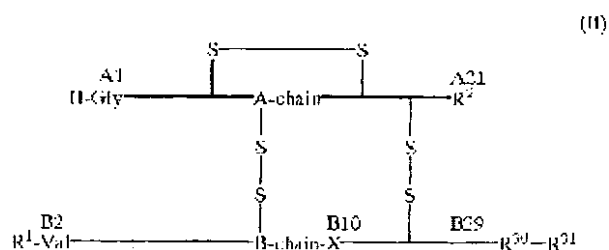
- 2.1. La solicitud objeto de la presente fue presentada el 30 de junio de 2010, reivindicando prioridad bajo la solicitud DE200810003568 del 2008-01-09; y fue publicada en Colombia, en la Gaceta de la Propiedad Industrial N° 631 del 22 de agosto de 2011, cuya publicación internacional corresponde a la WO 2009087081 del 2009-07-16.
- 2.2. La solicitud colombiana 10 79133 objeto de la presente oposición, se refiere a análogos de insulina con un perfil de tiempo/acción basal que se caracterizan por

los rasgos de que a) el extremo de la cadena B consiste en un residuo aminoácido de carácter básico, amidado, tal como lisina o argininamida, b) el residuo de aminoácido N-terminal de la cadena A de la insulina es un residuo lisina o arginina, c) la posición A8 del aminoácido está ocupada por un residuo histidina, d) la posición A21 del aminoácido está ocupada por un residuo glicina, y e) se efectúan una o más sustituciones y/o adiciones de residuos aminoácidos negativamente cargados en las posiciones A5, A15, A18, B-1, B0, B1, B 2, B3 y B4

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: US 6100376 publicada el 08 de agosto de 2000.
- D2: WO 2007081824 publicada el 19 de julio de 2007.

2.4. Ahora bien, el documento D1, se refiere a nuevos derivados de la insulina con un punto isoelectrónico entre 5 y 8,5, con una mayor estabilidad en medio acuoso ligeramente ácido y con un perfil de acción especial, y las sales fisiológicamente aceptables de estos derivados de insulina para el tratamiento de la diabetes mellitus; fórmula II:



en la que R1 significa H o H-Phe, R2 denota un Aminoácido genéticamente codificable que no contiene ningún grupo amida, R30 representa el residuo de un neutro genéticamente codificable Aminoácidos, R31 representa un grupo orgánico fisiológicamente aceptable que es básico en la naturaleza y tiene hasta 50

átomos de carbono, en cuya estructura de 0 a 3 alfa-aminoácidos están involucrados y cuyo grupo carboxilo terminal de la que está presente en su caso puede ser libre, en la forma de una funcionalidad éster, una funcionalidad amida, una lactona o reducida a CH_2OH , y X representa un genéticamente codificable aminoácido. Dicho documento D1 revela de forma particular en la descripción del radical R31 características como las presentes en los análogos de insulina de la solicitud objeto de la presente oposición, que mejoran el rendimiento.

2.5. Ahora bien, el documento D2 por su parte se refiere a la protección de las proteínas contra la fibrilación que puede ser otorgada por la introducción de algunas sustituciones de histidina en la proteína, de tal manera que un par de histidinas presentes con un espacio suficiente como para permitir que las histidinas coordinen con el zinc. En el caso de la insulina, la introducción de sustituciones de residuo de histidina mencionadas en el mismo documento D2 ofrecen una mayor resistencia a la fibrilación, manteniendo al menos una mayor parte de la actividad del análogo de la insulina. De igual manera, D2 menciona la posibilidad de utilizar las proteínas protegidas con dichas sustituciones de histidina para la fabricación de una composición farmacéutica y, adicionalmente el documento D2 se refiere a un método de tratamiento que consiste en suministrar una cantidad farmacéuticamente aceptable de la misma a un individuo. Finalmente de forma particular en la página 5, dicho documento D2 revela características que tienen un efecto de mejora de rendimiento, que pueden contener los análogos de insulina presentados. Por lo tanto, visto dicho documento D2 en combinación con el documento D1, la presente solicitud carece evidentemente de altura inventiva.

2.6. Por lo tanto, este documento objeto de oposición a la luz del documento D1 en combinación con el documento D2, carece de ALTURA INVENTIVA.

2.7. En consecuencia y de acuerdo a lo descrito anteriormente, se deriva que la solicitud colombiana 10 79133 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.

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

2.8.1. CARENCIA DE ALTURA INVENTIVA Según la Decisión 486 de la Comunidad Andina de Naciones, Artículo 18.- *“Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica.”* A la fecha de prioridad, 09 de enero de 2008, a partir del documento D2 en combinación con D1, un experto en la materia puede llegar de manera evidente a un análogo de insulina (como el YKL205) que comparado con uno ampliamente conocido en el arte como la insulina glargina es mejor pero en donde dichas características provienen de resultados esperados y combinaciones (radicales) conocidas; sobre el cual busca protección en el capítulo reivindicatorio.

2.9. 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 uno de los tres requisitos de patentabilidad.

2.10. Por todo lo anterior, atentamente solicito a usted que se sirva declarar fundada *“ANALOGOS DE INSULINA EN LOS CUALES EL EXTREMO DE LA CADENA B CONSISTE EN UN RESIDUO AMINOÁCIDO, EL RESIDUO DE AMINOÁCIDO N-TERMINAL DE LA CADENA A DE LA INSULINA ES UN RESIDUO LISINA O ARGININA, LA POSICIÓN A8 DEL AMINOÁCIDO ESTÁ OCUPADA POR UN RESIDUO HISTIDINA, LA POSICIÓN A21 DEL AMINOÁCIDO ESTÁ OCUPADA POR UN RESIDUO GLICINA, Y SE EFECTÚAN UNA O MÁS SUSTITUCIONES Y/O ADICIONES DE RESIDUOS AMINOÁCIDOS NEGATIVAMENTE CARGADOS EN LAS POSICIONES A5, A15, A18, B-1, B0, B1, B2, B3 Y B4”*, cuyo titular es SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH, solicitud Colombiana que apareció publicada en la Gaceta de la Propiedad Industrial N° 631 del 22 de agosto 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: US 6100376 publicada el 08 de agosto de 2000.
- D2: 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. Recibo de caja del respectivo pago de tasa.
4. Copias de los documentos:
 - D1: US 6100376 publicada el 08 de agosto de 2000.
 - D2: 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.



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. 10 079.133, titulada "ANÁLOGOS DE INSULINA EN LOS CUALES EL EXTREMO DE LA CADENA B CONSISTE EN UN RESIDUO AMINOÁCIDO, EL RESIDUO DE AMINOÁCIDO N-TERMINAL DE LA CADENA A-DE LA INSULINA ES UN RESIDUO LISINA O ARGININA, LA POSICIÓN A8 DEL AMINOÁCIDO ESTÁ OCUPADA POR UN RESIDUO HISTIDINA, LA POSICIÓN A21 DEL AMINOÁCIDO ESTÁ OCUPADA POR UN RESIDUO GLICINA, Y SE EFECTÚAN UNA O MÁS SUSTITUCIONES Y/O ADICIONES DE RESIDUOS AMINOÁCIDOS NEGATIVAMENTE CARGADOS EN LAS POSICIONES A5, A15, A18, B-1, B0, B1, B2, B3 Y B4", cuyo titular es **SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH**, publicada en la gaceta No. 631 del 22 de agosto 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 3 días del mes de Noviembre de 2011.

PROCAPS S.A.

C.C. N° 16'251.923

NIT: 890.106.527-5

Representante Legal

APROBADO

03 NOV. 2011

PROCAPS S.A.

NOTARIA TERCERA DEL CIRCULO DE BARRANQUILLA
DILIGENCIA DE RECONOCIMIENTO
Ante el Notario Tercero de Barranquilla se presento:
JOAQUIN TANAKA TAREKINA
Identificado con: C 16 257.923 P ALMIRA
Y declaro que el contenido del anterior Documento es cierto
y soy la firma que lo respalda.
Barranquilla: 09 NOV. 2011

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

NOTARIA TERCERA DEL CIRCULO
DE BARRANQUILLA
ALFONSO LUIS PINA FLORES
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
10*****

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."-----
DE BARRANQUILLA

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:

Numero	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
10*****

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

Dirección para notificaciones judiciales:

CL 80 No 78 B - 201.

De la ciudad de Barranquilla.

Correo electrónico:

mlozada@procaps.com.co

Página Web:

Teléfono:

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 D E

OBJETO SOCIAL: El objeto principal de la sociedad sera: a) La fabricación, importación y comercialización de alimentos procesados y suplementos dietarios. b) La fabricación 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 químicas, farmaceuticas, alimenticias y cosmeticas, para uso y consumo humano y veterinario. c) La investigación, desarrollo y fabricación de toda clase de productos y sustancias químicas, 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 fabricación de sustancias químicas, farmaceuticas, alimenticias y cosmeticas, asi como la comercialización interna y externa de los productos terminados. e) La compra, venta, importación, exportación y distribución de toda clase de elementos instrumentales y equipos medicos, quirurgicos, odontologicos y hospitalarios para la salud humana y animal. f) La compra, venta, exportación, fabricación, importación, distribución 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 realización 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, investigación,

***** 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

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

CAMARA DE COMERCIO
DE BARRANQUILLA

10*****

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

***** 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.

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. -----

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
 CAMARA DE COMERCIO
 DE BARRANQUILLA
 10*****

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 Rodriguez 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 2 a. 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 condicion de Presidente y -----
Representante Legaql 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
10*****

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 transaccion. 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 CHARRÍS 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 tambien los demas 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 tramites 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 ----
representacion de PROCAPS S.A.; endosen los titulos 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 tramite necesario para el cabal cumplimiento del presente mandato.-----

C E R T I F I C A

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 *****



***** Pag. 6

CAMARA DE COMERCIO
DE BARRANQUILLA

10*****

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 está 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 después de la correspondiente inscripción, siempre

***** 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, 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.

m. Rojas

ANEXO



US006100376A

United States Patent [19]
Dörschug

[11] Patent Number: 6,100,376
[45] Date of Patent: *Aug. 8, 2000

[54] A²¹, B³⁰, MODIFIED INSULIN DERIVATIVES
HAVING AN ALTERED ACTION PROFILE

[75] Inventor: Michael Dörschug, Bochum, Germany

[73] Assignee: Hoechst Aktiengesellschaft, Frankfurt
am Main, Germany

[*] Notice: This patent is subject to a terminal disclaimer.

[21] Appl. No.: 08/842,794

[22] Filed: Apr. 16, 1997

Related U.S. Application Data

[62] Division of application No. 08/304,593, Sep. 12, 1994, Pat. No. 5,656,722, which is a continuation of application No. 08/046,481, Apr. 9, 1993, abandoned, which is a continuation of application No. 07/929,510, Aug. 19, 1992, abandoned, which is a continuation of application No. 07/431,844, Nov. 6, 1989, abandoned.

[30] Foreign Application Priority Data

Nov. 8, 1988 [DE] Germany 3837825

[51] Int. Cl.⁷ A61K 38/28

[52] U.S. Cl. 530/303; 530/304; 514/3;
514/12

[58] Field of Search 530/303, 304;
514/3, 12

[56] References Cited

U.S. PATENT DOCUMENTS

4,608,364 8/1986 Grau 514/4
4,701,440 10/1987 Grau 514/3

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

62066/86 3/1987 Australia .
0 046 979 8/1981 European Pat. Off. .
0 194 864 9/1986 European Pat. Off. .
0 214 826 3/1987 European Pat. Off. .
0 254 516 1/1988 European Pat. Off. .

OTHER PUBLICATIONS

Sunby, F., "Separation and Characterization of Acid-induced Insulin Transformation Products by Paper Electrophoresis in 7 M Urea," The Journal of Biological Chemistry, vol. 237, No. 11, pp. 3406-3411 (1962).
Burgermeister, W., et al., The Isolation of Insulin from the Pancreas, Reprint from the Handbook of Experimental Pharmacology, pp. 715-727 (1975).
Neubauer, "The Immunogenicity of Different Insulins in Several Animal Species," Diabetes, vol. 27, No. 1 (1977), pp. 8-15.
Markussen et al., "Soluble, prolonged-acting insulin derivatives. II. Degree of protraction and crystallizability of insulins substituted in positions A17, B8, B13, B27 and B30," Protein Engineering 1(3):215-223 (1987).

J. Brange; Springer-Verlag, "Galenics Of Insulin, The Physico-chemical and Pharmaceutical Aspects of Insulin and Insulin Preparations," Berlin Heidelberg, pp. 35-36.

Markussen et al., "Soluble prolonged-acting insulin derivatives. III. Degree of protraction, crystallizability and chemical stability of insulins substituted in positions A21, B13, B23, B27, and B30," Protein Engineering 2(2):157-166 (1988).

Zinman, Bernard, "The Physiologic Replacement of Insulin," Medical Intelligence, vol. 32, No. 6, pp. 363-370 (1989).

Insulin Humanum, European Pharmacopoeia 838 (1993).

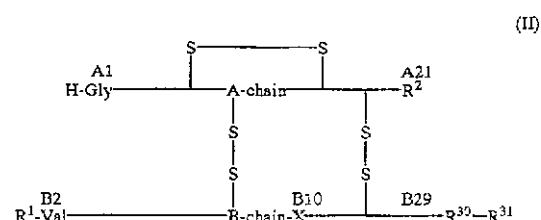
Primary Examiner—Michael P. Woodward

Assistant Examiner—David Lukton

Attorney, Agent, or Firm—Finnegan, Henderson, Farabow, Garrett & Dunner, L.L.P.

[57] ABSTRACT

New insulin derivatives of the formula II with an iso-electric point between 5 and 8.5, with improved stability in weakly acid aqueous medium and with a special action profile, and the physiologically tolerated salts of these insulin derivatives, for the treatment of diabetes mellitus; formula II is:



in which

R¹ denotes H or H-Phe,

R² denotes a genetically encodable L-amino acid which contains no amide group,

R³⁰ represents the residue of a neutral genetically encodable L-amino acid,

R³¹ represents a physiologically acceptable organic group which is basic in nature and has up to 50 carbon atoms, in whose structure 0 to 3 α -amino acids are involved and whose terminal carboxyl group which is present where appropriate can be free, in the form of an ester functionality, an amide functionality, a lactone or reduced to CH₂OH, and

X represents a genetically encodable L-amino acid.

12 Claims, No Drawings

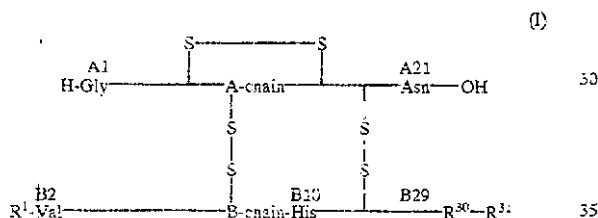
A²¹, B³⁰, MODIFIED INSULIN DERIVATIVES HAVING AN ALTERED ACTION PROFILE

This is a division of application Ser. No. 08/304,593, filed Sep. 12, 1994, now U.S. Pat. No. 5,656,722, which is a continuation of application Ser. No. 08/046,481, filed Apr. 9, 1993, abandoned, which is a continuation of application Ser. No. 07/929,510, filed Aug. 19, 1992 abandoned, which is a continuation of application Ser. No. 07/431,844, filed Nov. 6, 1989, now abandoned.

BACKGROUND OF THE INVENTION

As is known, insulin and insulin derivatives are required in considerable quantities for the treatment of the disease diabetes mellitus, and some of them are also produced on an industrial scale. Despite the considerable number of insulin compositions and modifications with different action profiles which are already in existence, there is still a need, because of the variety of organisms with their inter- and intraindividual variations, for other insulin products which in turn have other properties and action characteristics.

Insulin derivatives with a delayed action are described, for example, in EP-B 132,769 and EP-B 132,770. These are specifically derivatives with a basic modification in position B31 of the insulin B chain, of the following formula I:



in which R¹ denotes H or H-Phe,

R³⁰ represents the residue of a neutral, genetically encodable L-amino acid, and

R³¹ represents a physiologically acceptable organic group which is basic in nature and has up to 50 carbon atoms, in whose structure 0 to 3 α-amino acids are involved and whose terminal carboxyl group which is present where appropriate can be free, in the form of an ester functionality, an amide functionality, a lactone or reduced to CH₂OH.

Characteristic of these insulin derivatives is an iso-electric point between 5.8 and 8.5 (measured by iso-electric focusing). The fact that the isoelectric point is shifted from the isoelectric point of unmodified natural insulin or proinsulin (at pH=5.4) into the neutral range derives from the additional positive charge(s) located on the surface of the molecule as a result of the basic modification. This makes these insulin derivatives with a basic modification less soluble in the neutral range than, say, natural insulin or proinsulin, which are normally dissolved in the neutral range.

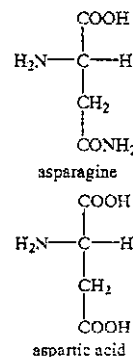
The delaying or depot action of the insulin derivatives with a basic modification, of the formula I, derives from their sparing solubility at the isoelectric point. According to the two abovementioned publications, the redissolution of the insulin derivatives under physiological conditions is achieved by elimination of the additional basic groups, which is brought about, depending on the derivative, by trypsin or trypsin-like and/or carboxypeptidase B or carboxypeptidase B-like and/or esterase activity. The eliminated

groups are in each case either purely physiological metabolites or else easily metabolized physiologically acceptable substances.

The abovementioned depot principle resulting from basic modification of the insulin has also been further utilized by the provision and corresponding use of other insulin derivatives with basic modifications, mainly within the A and B chains; cf. for example EP-A 0,194,864 and EP-A 0,254,516.

In the insulin derivatives specified in EP-A 0,194,864, a basic amino acid is incorporated in the B27 position and/or a neutral amino acid is located at positions A4, A17, B13 and/or B21; in addition, the C-terminal carboxyl group of the B chain is blocked by an amide or ester residue.

The insulin derivatives specified in EP-A 0,254,516 are very similar to those specified in the abovementioned EP-A; however, in this case, with the aim of increasing the stability of the relevant pharmaceutical compositions at the weakly acid pH values, the amino acid Asn in position A21 can also be replaced by other amino acids which are more stable in acid medium, such as, for example, Asp. As is known, Asn (=asparagine) differs from Asp (=aspartic acid) by the blocking of one of the two carboxyl groups by the amide group:



Rapid-acting insulin derivatives are said to result from yet another modification of the insulin molecule in the A and B chain, in particular by replacing the amino acid His, which is responsible for the formation of a complex with zinc—and thus for a certain delaying action, in the B10 position by other appropriate amino acids; cf. EP-A 0,214,826.

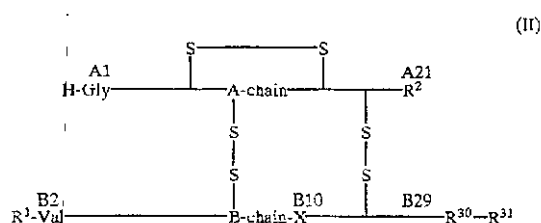
All the insulin derivatives specified in the 3 last-mentioned publications are mainly modified within the A and B chains; they are prepared by genetic engineering routes.

In the attempt to increase the stability in acid medium of the insulin derivatives with a basic modification on the C-terminal end of the B chain as specified in the European Patents EP-B 0,132,769 and EP-B 0,132,770 mentioned in the introduction, and, where appropriate, also to alter the action profile thereof, it has now been found that this object is achieved in an advantageous manner by replacing Asn^{A21} by other genetically encodable amino acids which contain no amide group and, where appropriate, by replacing His^{B10} by other genetically encodable amino acids.

SUMMARY OF THE INVENTION

Hence the invention relates to insulin derivatives of the formula II

3



in which

R^1 denotes H or H-Phe,

R^2 denotes a genetically encodable L-amino acid which contains no amide group,

R^{30} represents the residue of a neutral genetically encodable L-amino acid,

R^{31} represents a physiologically acceptable organic group which is basic in nature and has up to 50 carbon atoms, in whose structure 0 to 3 α -amino acids are involved and whose terminal carboxyl group which is present where appropriate can be free, in the form of an ester functionality, an amide functionality, a lactone, or reduced to CH_2OH , and

x represents a genetically encodable L-amino acid, having an isoelectric point between 5 and 8.5, and the physiologically tolerated salts thereof.

DETAILED DESCRIPTION

The new insulin derivatives and the physiologically tolerated salts thereof are stable at the weakly acid pH values of appropriate pharmaceutical compositions even for extended periods and have—especially when His^{B10} has also been replaced by other amino acids—an altered (shorter) action profile compared with the known—unaltered—insulin derivatives with a basic modification of the formula I indicated in the introduction.

R^1 in formula II is preferably H-Phe.

Genetically encodable L-amino acids containing no amide group—for R^2 —are Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Asp, Glu, Cys, Met, Arg, Lys, His, Tyr, Phe, Trp, Pro; Gly, Ala, Ser, Thr, Asp and Glu are preferred, especially Asp.

Neutral genetically encodable L-amino acids—for R^{30} —are Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Asn, Gln, Cys, Met, Tyr, Phe and Pro; Ala, Thr and Ser are preferred.

R^{31} is a physiologically acceptable organic group which is basic in nature and has up to 50 carbon atoms and in whose structure 0–30 α -amino acids are involved. When no α -amino acids are involved in the structure of R^{31} , examples of suitable basic groups for this residue are the following:

amino-(C_2 - C_6)-alkoxy, (C_1 - C_4)-alkylamino-(C_2 - C_6)-alkoxy, di-(C_1 - C_4)-alkylamino-(C_2 - C_6)-alkoxy, tri-(C_1 - C_4)-ammonio-(C_2 - C_6)-alkoxy, amino-(C_2 - C_6)-alkylamino, [(C_1 - C_4)-alkyl-amino]-(C_2 - C_6)-alkylamino, di-(C_1 - C_4)-alkylamino-(C_2 - C_6)-alkylamino or [tri-(C_1 - C_4)-alkylamino]-(C_2 - C_6)-alkylamino, especially $-O-[CH_2]_p$, NR_2 , $[-O-]CH_2$, N^+R_3 , $-NH-[CH_2]_p$, NR_2 or $-NH-[CH_2]_p$, N^+R_3 , in which p is 2 to 6, and R is identical or different and represents hydrogen or (C_1 - C_4)-alkyl.

When up to 3 α -amino acids are involved in the structure of R^{31} , these are primarily neutral or basic naturally occurring L-amino acids and/or the D-amino acids corresponding thereto. Neutral naturally occurring amino acids are, in particular, Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Asn, Gln, Cys,

4

Met, Tyr, Phe, Pro and Hyp. Basic naturally occurring amino acids are, in particular, Arg, Lys, Hyl, Orn, Cit and His. If only neutral α -amino acids are involved, the terminal carboxyl group thereof cannot be free—in order for R^{31} to be basic in nature; on the contrary, the carboxyl group must in this case be amidated or esterified with a basic group, suitable basic groups for this being, for example, the above-mentioned basic groups—in the case where no α -amino acids are involved in the structure of R^{31} . Of course, these basic ester or amide groups can also block the carboxyl group of basic α -amino acids. Also possible and suitable for blocking the carboxyl group of the basic α -amino acids are—if the blocking is desired—neutral ester or amide groups such as, for example, (C_1 - C_6)-alkoxy, (C_3 - C_6)-cycloalkyloxy, NH_2 , (C_1 - C_6)-alkylamino or di-(C_1 - C_6)-alkylamino.

Of course, the terminal carboxyl group can be in the form of a lactone only if the terminal amino acid is a hydroxyamino acid.

Moreover, the terminal carboxyl group can also be reduced to CH_2OH .

R^{31} is preferably composed of 1, 2 or 3 of the above-mentioned basic naturally occurring amino acids; R^{31} is particularly preferably Arg-OH or Arg-Arg-OH.

Suitable genetically encodable L-amino acids—for x—are the same amino acids as for R^2 , but the genetically encodable L-amino acids which contain an amide group—which are Asn and Gln—are also possible in this case; the latter—Asn and Gln—are in fact preferred in this case. If Asn or Gln is located in position B10, the amide group is at least stable in weakly acid medium (in contrast to Asn or Gln in position A21).

The sequences (A1–A20) and (B1–B9, B11–B29) are preferably the sequences of human, porcine or bovine insulin, especially the sequences of human insulin.

Examples of insulin derivatives of the formula II are:

Asp ^{A21} -Human	insulin-Arg ^{A21} -OH
Glu ^{A21}	"
Gly ^{A21}	"
Ser ^{A21}	"
Thr ^{A21}	"
Ala ^{A21}	"
Asp ^{A21} -Human	insulin-Arg ^{B31} -Arg ^{B32} -OH
Glu ^{A21}	"
Gly ^{A21}	"
Ser ^{A21}	"
Thr ^{A21}	"
Ala ^{A21}	"
Asp ^{A21} -Asn ^{B10} -Human	insulin-Arg ^{B31} -OH
Glu ^{A21}	"
Gly ^{A21}	"
Ser ^{A21}	"
Thr ^{A21}	"
Ala ^{A21}	"
Asp ^{A21} -Asn ^{B10} -Human	insulin-Arg ^{B31} -Arg ^{B32} -OH
Glu ^{A21}	"
Gly ^{A21}	"
Ser ^{A21}	"
Thr ^{A21}	"
Ala ^{A21}	"

The insulin derivatives of the formula II are prepared mainly by a genetic manipulation by means of site-directed mutagenesis using standard methods.

For this purpose, a gene structure coding for the desired insulin derivative of the formula II is constructed and its expression is brought about in a host cell—preferably in a bacterium such as *E. coli* or a yeast, in particular *Saccharomyces cerevisiae*—and—if the gene structure codes for a

fusion protein—the insulinderivative of the formula II is liberated from the fusion protein; analogous methods are described, for example, in EP-A 0,211,299, EP-A 0,227,938, EP-A 0,229,998, EP-A 0,286,956 and German Patent Application P 38 21 159.9 dated Jun. 23, 1988 (HOE 88/F 158). After cell disruption, the fusion protein portion is eliminated either chemically using cyanogen halide—cf. EP-A 0,180,920 or enzymatically using lysostaphin—cf. DE-A 3,739,347.

The insulin precursor is then subjected to oxidative sulfotolysis by the method described, for example, by R. C. Marshall and A. S. Inglis in "Practical Protein Chemistry—A Handbook" (edited by A. Darbre) 1986, pages 49–53, and subsequently renatured in the presence of a thiol with the formation of the correct disulfide bridges, for example by the method described by G. H. Dixon and A. C. Wardlaw in Nature (1960), pages 721–724.

The C peptide is removed by cleavage with trypsin—for example by the method of Kemmler et al., J.Biol. Chem. (1971), pages 6786–6791, and the insulin derivative of the formula II is purified by known techniques such as chromatography—cf., for example, EP-A-0,305,760—and crystallization.

The insulin derivatives of the formula II with $R^2 = \text{Asp}$ and $X = \text{His}$ are expediently prepared by hydrolysis of the known insulin derivatives which have a basic modification and the formula I in aqueous acidic medium (because only the amide group of the asparagine in position A21 must be hydrolyzed in this case), preferably at pH values between about 2 and about 4, in particular of about 2.5, and at temperatures of about 0 to about 40° C., preferably at room temperature.

The insulin derivatives of the formula II, according to the invention, and/or the physiologically tolerated salts thereof (such as, for example, the alkali metal or ammonium salts) are mainly used as active substances for a pharmaceutical composition for the treatment of diabetes mellitus.

The pharmaceutical composition is preferably a solution or suspension for injection; it contains at least one insulin derivative of the formula II and/or at least one of the physiologically tolerated salts thereof in dissolved, amorphous and/or crystalline—preferably in dissolved—form.

The composition preferably has a pH between about 2.5 and 8.5, in particular between about 4.0 and 8.5, and contains a suitable tonicity agent, a suitable preservative and, where appropriate, a suitable buffer, as well as preferably a certain zinc ion concentration, all, of course, in sterile aqueous solution. All the ingredients of the composition apart from the active substance form the composition vehicle.

Examples of suitable tonicity agents are glycerol, glucose, mannitol, NaCl, and calcium or magnesium compounds such as CaCl_2 , MgCl_2 etc.

The choice of the tonicity agent and/or preservative influences the solubility of the insulin derivative or the physiologically tolerated salt thereof at the weakly acid pH values.

Examples of suitable preservatives are phenol, m-cresol, benzyl alcohol and/or p-hydroxybenzoic esters.

Examples of buffer substances which can be used, in particular for adjusting a pH between about 4.0 and 8.5, are sodium acetate, sodium citrate, sodium phosphate etc. Otherwise, also suitable for adjusting the pH are physiologically acceptable dilute acids (typically HCl) or alkalis (typically NaOH).

When the composition contains zinc a content of 1 μg to 2 mg, in particular from 5 μg to 200 μg , of zinc/ml is preferred.

In order to vary the action profile of the composition according to the invention it is also possible to admix unmodified insulin, preferably bovine, porcine or human insulin, in particular human insulin.

Preferred concentrations of active substance are those corresponding to about 1–1500, also preferably about 5–1000, and in particular about 40–400, international units/ml.

The invention is now explained in detail by the examples which follow.

A) Preparation by Genetic Manipulation

EXAMPLE 1

Construction of a plasmid for the preparation of Gly (A21)-human insulin Arg (B31-OH)

The plasmid pSW3 has been described in German Patent Application P 38 21 159.9 (HOE 88/F 158). The plasmid DNA is reacted with the restriction enzymes PvuII and SalI and subsequently treated with bovine alkaline phosphatase. The two resulting fragments are separated by gel electrophoresis, and the large fragment is isolated. This fragment is linked in a T4 DNA ligase reaction with the following synthetic DNA sequence:

5'—CTG GAA AAC TAC TGT GGT TGA TAG GAC
CTT TTG ATG ACA CCA ACT ATC AGCT—5'

Competent *E. coli* W3110 cells are transformed with the ligation mixture. The transformation mixture is plated out on NA plates which contain 20 μg of Ap (=Ampicillin)/ml and incubated at 37° C. overnight. An overnight culture is obtained from single colonies, and plasmid DNA is obtained from this. This DNA is characterized by means of restriction analysis and DNA sequence analysis. Correct plasmids which encode the modified A chain are called pIK100. Expression is carried out in analogy to Example 3 of the abovementioned German Patent Application P 38 21 159.9. The modified mono-Arg-insulin is likewise prepared in analogy to the preparation of the unmodified mono-Arg-insulin described in this German Patent Application.

EXAMPLE 2

Construction of a Plasmid for the Preparation of Ser(A21)-human Insulin (Arg B31-OH)

The construction corresponds to the route described in the above example. The synthetic DNA sequence is, however, modified as follows:

5'—CTG GAA AAC TAC TGT TCA TGA TAG GAC
CTT TTG ATG ACA AGT ACT ATC AGCT—5'

The plasmid pIK110 which has an additional BspHI recognition sequence is obtained.

EXAMPLE 3

Construction of a Plasmid for the Preparation of Gly(A21)-Asn(B10)-human Insulin Arg(B31-OH)

DNA from the plasmid pIK100 is cleaved with the restriction enzymes HpaI and DraIII and treated with bovine alkaline phosphatase. The two resulting fragments are separated by gel electrophoresis, and the larger of the two fragments is isolated. The fragment is ligated with the synthetic DNA sequence

5'—AAC CAA CAC TTG TGT GGT TCT AAC TTG
TTG GTT GTG AAC ACA CCA A&A TTG—5'

and competent *E. coli* W3110 cells are transformed with the ligation mixture. Further characterization of the resulting plasmid pIK101 is carried out as described in Example 1.

EXAMPLE 4

Construction of a Plasmid for the Preparation of Ser(A21)-Asn(B10)-human Insulin

The construction corresponds to the cloning described in Example 3, but starting from DNA from the plasmid pIK110. The newly constructed plasmid is called pIK111.

EXAMPLE 5

Construction of an Expression Plasmid for Monkey Proinsulin

Monkey proinsulin differs from human proinsulin merely by replacement of a single amino acid in the C peptide (B37-Pro in place of Leu in this position of human proinsulin).

The plasmid pSW3 is opened with HpaI and SalI and the remaining plasmid DNA is isolated. The DraIII-SalI monkey proinsulin fragment is isolated from the plasmid pK50 described in EP-A0, 229,998. The two fragments are linked to the synthetic DNA fragment

5'-AAC CAG CAC CTG TGC GGT TCT CAC CTA TTG GTC GTG GAC ACG CCA AGA GTG-5'

in a T4 DNA ligase reaction. The plasmid pSW2 is obtained, and its DNA is used hereinafter as starting material for the constructions of the expression plasmids encoding the di-Arg-human insulin derivatives.

EXAMPLE 6

Construction of a Plasmid for the Preparation of Gly(A21)-human Insulin Arg(B31)-Arg(B32)-OH

DNA of the plasmid pSW2 is cleaved with PvuII and SalI in accordance with Example 1 and ligated with the synthetic DNA from Example 1; the result is the plasmid pSW21.

EXAMPLE 7

Construction of a Plasmid for the Preparation of Ser(A21)-human Insulin-Arg(B31)-Arg(B32)-OH

The plasmid pSW22 is constructed starting from pSW2 DNA in analogy to Example 2.

EXAMPLE 8

Construction of a Plasmid for the Preparation of Gly(A21)-Asn(B10)-human Insulin-Arg(B31)-Arg(B32)-OH

The plasmid pSW23 is constructed starting from pSW21 DNA in analogy to Example 3.

The following sequence is used as synthetic DNA sequence for this:

5'-AAC CAA CAC TTG TGT GGT TCT AAC CTA TTG GTT GTG AAC ACA CAA AGA TTG-5'

EXAMPLE 9

Construction of a Plasmid for the Preparation of Ser(A21)-Asn(B10)-human Insulin-B31(Arg)-B32(Arg)-OH

The plasmid pSW24 is constructed starting from pSW22 DNA in analogy to Example 4 using the synthetic DNA sequence described in Example 8.

B) Preparation of Asp^{A21}-human Insulin-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH from Human Insulin-Arg^{A31}-Arg^{B32}-OH by Hydrolysis

1 g of human insulin-Arg^{A31}-Arg^{B32}-OH is suspended in 100 ml of H₂O. The pH is adjusted to 2.5 by addition of HCl, and the solution is left at 37° C. After one week about one half of the material has been converted into Asp^{A21}-human insulin-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH. The product is separated from the starting material in a manner known per se on an anion exchanger, is precipitated from the eluate and is crystallized in a buffer which contains 10.5 g of citric acid, 1 g of phenol and 5 ml of a 1% strength zinc chloride solution per liter with a protein concentration of 5 g/l at pH 6.0. The yield is 390 mg of Asp^{A21}-human insulin-Arg^{B31}-Arg^{B32}.

C) Preparation of an Injection Solution

The insulin derivative from B is dissolved at a concentration of 1.4 mg/ml in a sterile vehicle solution of the following composition (per ml):

18 mg of glycerol, 10 mg of benzyi alcohol, 80 μg of Zn²⁺, pH 4.0.

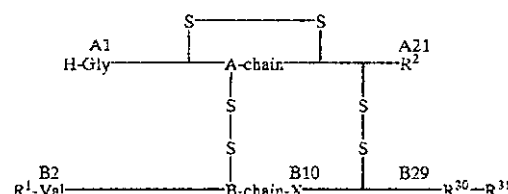
D) Action Profile of an Asp^{A21}-human Insulin-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH Composition in dogs by comparison with human insulin-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH and basal H insulin Hoechst^(R) = an NPH (neutral protamine Hagedorn) composition containing about 10 μg of Zn²⁺.

		Blood glucose as a % of the initial level in hours (h)				
Product		1 h	2 h	3 h	5 h	7 h
According to the invention	Asp ^{A21} -human insulin	99	62	51	75	98
	Arg ^{B31} -Arg ^{B32} -OH					
	Human insulin	77	52	64	85	98
	Arg ^{B31} -Arg ^{B32} -OH					
	Basal H insulin Hoechst ^(R)	71	49	59	83	100

This example shows that Asp^{A21}-human insulin-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH has the same advantageous basal profile as human insulin-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH. In addition, Asp^{A21}-human insulin-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH has the advantageous property that the compound is stable for a long time under the chosen conditions.

1 claim:

1. An insulin derivative having an isoelectric point between 5 and 8.5, or a physiologically tolerated salt thereof, of the formula II



in which:

R¹ at position B1 denotes H or H-Phe,

R² at position A21 denotes a genetically encodable L-amino acid selected from the group consisting of Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Ser, Thr, Tyr, Asp, and Glu,

R³⁰ represents the residue of a neutral genetically encodable L-amino acid selected from the group consisting of Tyr, Gly, Phe, and Thr,

R³¹ represents 1, 2, or 3 neutral or basic α-amino acids, whose terminal carboxyl group can be free or in the form of an amide functionality;

X represents His at position B10; and

the sequences A1 to A20 and B2 to B29 in Formula II correspond to a mammalian insulin.

2. An insulin derivative or the physiologically tolerated salt thereof as claimed in claim 1, wherein R¹ in formula II represents H-Phe.

3. An insulin derivative or the physiologically tolerated salt thereof as claimed in claim 1, wherein R² in formula II represents Gly.

4. An insulin derivative or the physiologically tolerated salt thereof as claimed in claim 1, wherein R³⁰ in formula II represents Thr.

5. An insulin derivative or the physiologically tolerated salt thereof as claimed in claim 1, wherein the sequences

7A

9

(A1 to A20) and (B2 to B9 and B11 to B29) in Formula II are the corresponding sequences of human, porcine, or bovine insulin.

6. An insulin derivative or the physiologically tolerated salt thereof as claimed in claim 1, wherein R³⁰ in formula II represents Gly.

7. An insulin derivative or the physiologically tolerated salt thereof as claimed in claim 1, wherein R³⁰ in formula II represents Phe.

8. An insulin derivative or the physiologically tolerated salt thereof as claimed in claim 1, wherein R³⁰ in formula II represents Tyr.

9. A pharmaceutical composition that contains an effective amount of at least one insulin derivative of the formula

10

II, or at least one of the physiologically tolerated salts thereof, as claimed in claim 1, in dissolved, amorphous or crystalline form.

10. A pharmaceutical composition as claimed in claim 9, which additionally contains 1 µg to 2 mg. of zinc/ml.

11. A pharmaceutical composition as claimed in claim 9, which additionally contains unmodified insulin.

12. A method for treating a patient suffering from diabetes mellitus, which comprises administering to said patient a pharmaceutical composition as claimed in claim 9.

* * * * *

ANEXO 2

(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
300, 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.

(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.

WO 2007/081824 A2

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

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 histidine 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

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

37

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.