



Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21 EXPEDIENTE No.

05-122775

54 TÍTULO

PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN FACTOR QUIMIOTACTICO

MODIFICADO EN EL N-TERMINAL

51 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A 51 K 14/52
A61K 39/19

71 SOLICITANTE

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

DOMICILIO

Ingelheim am Rhein, República Federal de Alemania.

74 APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

22 BOGOTÁ, D. C.,



07-12-05 (1' J)


Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
 Radicación: 05122775 00000000 Folios: 113
 Fecha (MM): 2005-12-02 17:22:13
 Trámite: 011 PCT-PATENT 378 FASE NACI 411 PRESENTAC
 Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT**
ENTRADA EN FASE NACIONAL 02-12-2005

1 SOLICITUD DE ☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad ☒ Capítulo I ☐ Capítulo II									
2 LICITANTE (71)	Nombre BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH sociedad constituida y existente bajo las leyes de la República Federal de Alemania Dirección Binger strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein República Federal de Alemania Domicilio Ingelheim am Rhein República Federal de Alemania	IDENTIFICACIÓN C C ☐ NIT ☐ C E ☐ Otro ☐ Cual _____ Numero _____							
3 REPRESENTANTE APODERADO	Nombre EMILIO FERRERO Dirección Carrera 4ª No 72-35 Teléfono 347 38 11 Fax 211 88 50 E-mail clientes@camyp.com Domicilio Bogotá, Colombia	IDENTIFICACIÓN C C ☒ NIT ☐ C E ☐ Otro ☐ Cual _____ Numero 438 019 T P 31 929							
4 INVENTOR (ES) (72)	<table border="0"> <tr> <td> 1 Robert WANDL ✓ Landstrasse Hauptstrasse 10/101 Viena 1030 Austria </td> <td> 2 Roman NECINA ✓ Schillgasse 32/18, Viena 1210 Austria </td> </tr> <tr> <td> 3 Randolph SEIDLER ✓ 4 Lester Road, Sandy Hook Connecticut 06482 Estados Unidos de América </td> <td> 4 Martin LENTER ✓ Promenade 23, Ulm 89073 República Federal de Alemania </td> </tr> <tr> <td> 6 Hendr DOODS ✓ Freiherr-von-Koenig-Strasse 6 Warthausen 8847 República Federal de Alemania </td> <td></td> </tr> </table>			1 Robert WANDL ✓ Landstrasse Hauptstrasse 10/101 Viena 1030 Austria	2 Roman NECINA ✓ Schillgasse 32/18, Viena 1210 Austria	3 Randolph SEIDLER ✓ 4 Lester Road, Sandy Hook Connecticut 06482 Estados Unidos de América	4 Martin LENTER ✓ Promenade 23, Ulm 89073 República Federal de Alemania	6 Hendr DOODS ✓ Freiherr-von-Koenig-Strasse 6 Warthausen 8847 República Federal de Alemania	
1 Robert WANDL ✓ Landstrasse Hauptstrasse 10/101 Viena 1030 Austria	2 Roman NECINA ✓ Schillgasse 32/18, Viena 1210 Austria								
3 Randolph SEIDLER ✓ 4 Lester Road, Sandy Hook Connecticut 06482 Estados Unidos de América	4 Martin LENTER ✓ Promenade 23, Ulm 89073 República Federal de Alemania								
6 Hendr DOODS ✓ Freiherr-von-Koenig-Strasse 6 Warthausen 8847 República Federal de Alemania									
5 PCT (86) Solicitud Internacional No <u>PCT/EP2004/003858</u> Fecha <u>13 de abril de 2004</u> Publicación Internacional No <u>WO 2004/096850 A1</u> Fecha <u>11 de noviembre de 2004</u>									
6 Título (54) <u>PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN FACTOR QUIMIOTACTICO MODIFICADO EN EL N-TERMINAL</u>									
7 Clasificación Internacional (51) <u>CO7K 14/52</u>									
8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>EP</u>	(32) Fecha <u>2 de mayo de 2003</u>	(31) Número de Solicitud <u>03010014 3</u>						
9 Comprobante de pag No <u>05-81,677</u> Fecha <u>octubre 24 de 2005</u>									

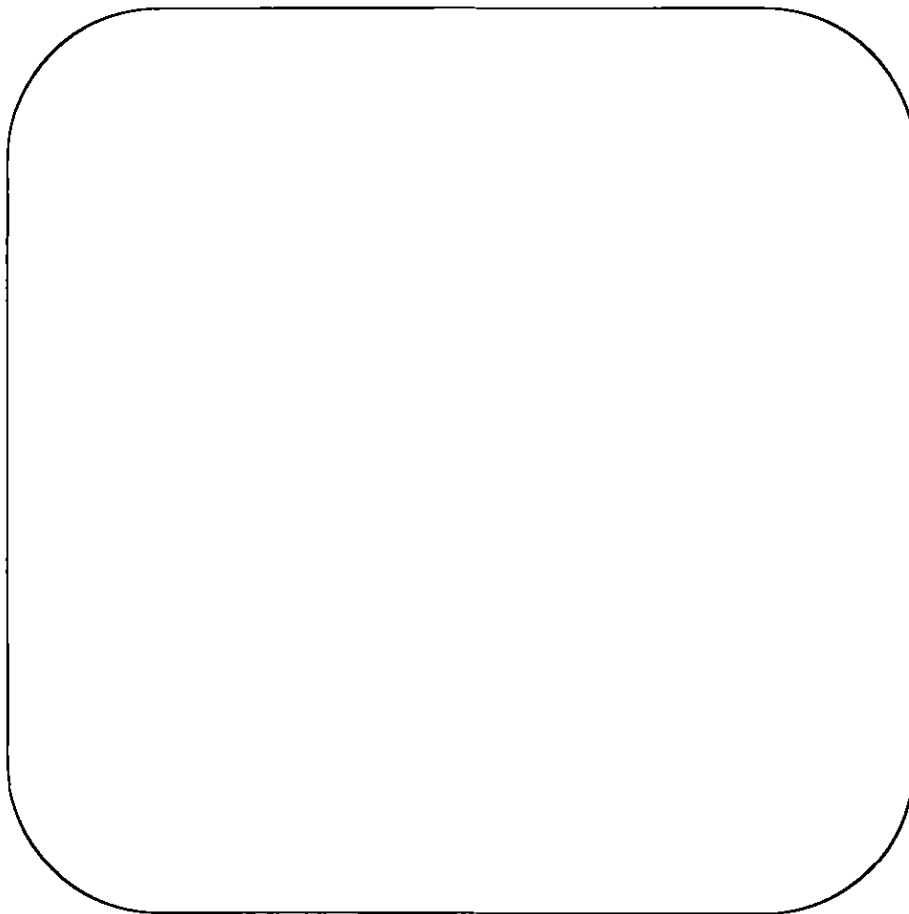
10

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 443 000 oo
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☒ Otros VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE

EMILIO FERRERO

FIRMA

C C 438 019 de Usaquén T P 31 929

JDF

DOCUMENTOS ANEXOS

- 1 ☒ **Publicación Internacional WO 2004/096850 A1**

Descripción

Páginas 26 en el idioma original

Páginas 29 en español

Reivindicaciones Número (s) 15

Figuras Número (s) 8

- 2 ☒ **Forma PCT/ISA/210 Informe de Búsqueda Internacional**
- 3 ☒ **Forma PCT/ISA/237 Opinión Escrita De La Administración Encargada De La Búsqueda Internacional**
- 4 ☒ ☒ **Extracto de publicación**

NO SE REALIZARON MODIFICACIONES
EN FASE INTERNACIONAL

CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA

MUNICH

Nr 169

El Cónsul General de Colombia

C E R T I F I C A

Que el Dr. Harms Paul Tutenberg -----, quién autentica la firma del signatario en el presente documento, ejercía en la fecha allí indicada las funciones de Presidente del Tribunal Regional en Mainz -----

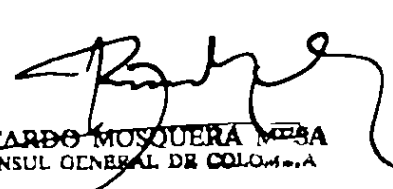
Que la firma BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GmbH, domiciliada en 55216 Ingelheim am Rhein, Registro Mercantil Nr. HR B 1063 del Juzgado Municipal de Bingen ----- está constituida y ejerce su objeto social de conformidad con las leyes de la República Federal de Alemania

Que ~~los señores Dr. DIETER LAUDIN Y Dr. GERHARD HUBER~~ -----

quien(es) firman el presente documento tiene (n) facultad legal suficiente para representar a la mencionada firma y otorgar poderes en su nombre

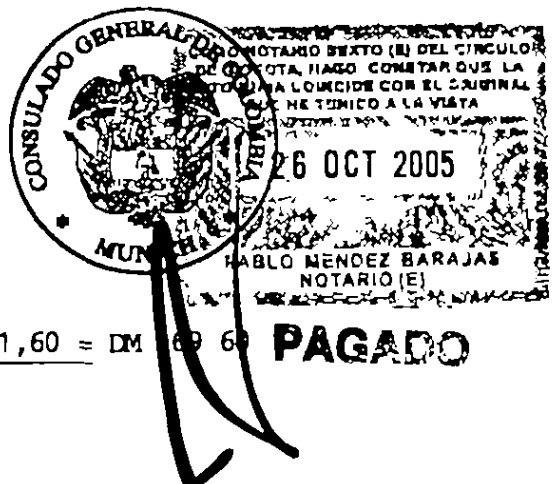
Que ha tenido a la vista la documentación que prueba lo anterior

Munich, 18 de Diciembre de 1995


RICARDO MOSQUERA MESA
CONSUL GENERAL DE COLOMBIA

Derechos para la Nación
Fondo Rotatorio
Tasa consular

US \$ 6 -
US \$ 100 -
US \$ 1 x DM 1,60 = DM 69 60



BOF 11 12 07 1



COMO NOTARIO SEXTO DE DEL CIRCULO
DE BOGOTA HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
26 OCT 2005
PABLO MENDEZ BARRAJAS
NOTARIO

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
Mosquera
Hoy EN - 11 A 11 44
DEL GALILACIONES
DEL DE BOGOTA D C
NO SE ASUME
SPORE: 1040 DEL TCA. 3

1-0457334027

REPRESENTACION Y PODER

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans.

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales.

REPRESENTATION AND
POWER OF ATTORNEY

9255
0569

I (we), the undersigned /Yo (nosotros), abajo firmado (s)
BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

of/domiciliado (s) en D-55216 Ingelheim am Rhein,
GERMANY

por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa 832, GONZALO PERDOMO, tpa 831, EMILIO FERRERO, tpa 31929 y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa 23555, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero, y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como tribunales de arbitramento en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales, el registro de marcas de fábrica colectivas defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen, su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria, y el registro de licencias de uso de esos derechos, b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos, acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistirse, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiales.

In due compliance with the terms of paragraph 1st of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint GERMAN CAVELIER tpa 832, GONZALO PERDOMO, tpa 831, EMILIO FERRERO, tpa 31929, and LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa 23555, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad, and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us), before any authorities or persons, with or without jurisdiction, especially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models, industrial designs, the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, vegetal varieties and denominations of origin, its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights, b) Actions of unfair competition, protection of the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights, actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Given and signed this/Dado y firmado hoy

Ingelheim am Rhein, 12.12 1995

BOEHRINGER INGELHEIM

In/en

INTERNATIONAL GMBH

Dr Dieter Laudien

Dr Gerhard Huber

Signature

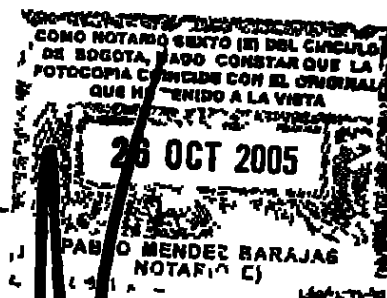
Firma

LEGALIZACION

El Señor- Cónsul de Colombia debe expedir un *certificado consular* sobre (1) la existencia legal de la compañía que otorga el poder, (2) que ésta ejerce su objeto social, y (3) que las personas que otorgan el poder están autorizadas para darlo. A este efecto les solicitamos que muestren al Señor Cónsul las pruebas que acreditan esos hechos (1), (2) y (3).

LEGALIZATION

The Colombia Consul must issue a *consular certificate* on the legal existence of the company which grants Power-of-Attorney, (2) that it is in actual exercise of company purposes, and (3) that the persons who execute the Power of Attorney is authorized to do so. To this effect, please show the Consul the evidence to prove the above facts (1), (2) and (3).



NOTA PARA EL SEÑOR CONSUL DE COLOMBIA Según los artículos 65 del C de P C y 480 del C de Co, si el poderdante es una sociedad, el Señor Cónsul debe certificar que tuvo a la vista las pruebas de su existencia, que ejerce su objeto social y que quien confiere el poder es su representante

Vorseitige vor mir gefertigte Namensunterschriften der Herren

1 Dr Dieter L a u d i e n Dipl -Chemiker, wohnhaft in 55127 Mainz,

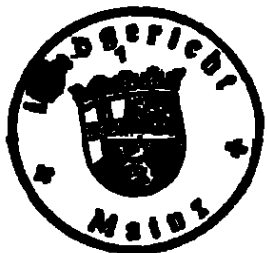
2 Dr Gerhard H u b e r Rechtsanwalt wohnhaft in 55411 Bingen

- mir bekannt -

beglaubige ich hiernit

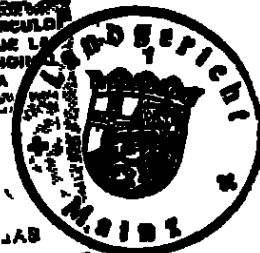
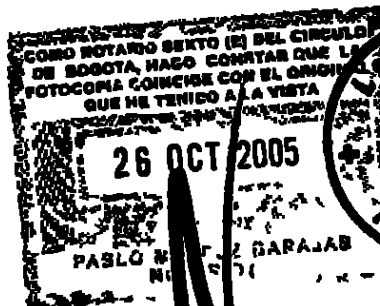
Gleichzeitig bescheinige ich aufgrund heutiger Einsichtnahme in das Handelsregister des Amtsgerichts Bingen daß die Firma Boehringer Ingelheim International GmbH mit Sitz in Ingelheim am Rhein im Handelsregister des Amtsgerichts Bingen unter HR B 1063 eingetragen ist und daß die Herren Dr Laudien und Dr Huber als Prokuristen gemeinschaftlich zur Vertretung der Gesellschaft berechtigt sind

Ingelheim am Rhein, den 12 Dezember 1995/hün

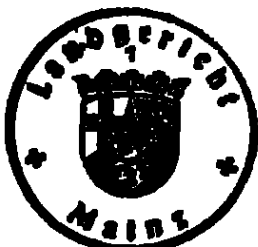


- 910 E 1 -


Notariatsverweser
anstelle des Notars
Prof Dr Weinich in Ingelheim



Die Echtheit vorstehender Unterschrift des Notariatsassessors Dr. Peter Wirth - Notariatsverweser anstelle des Notars Prof Dr Weinich in Ingelheim und die Echtheit des beigedruckten Dienst - ~~schenks~~ - siegels werden hierdurch bestätigt. Zugleich wird bescheinigt, daß der Vorgenannte zur Vornahme der Amtshandlung gesetzlich befugt war.



Mainz, den dreizehnten Dezember neunzehnhundertfünfundneunzig
Der Präsident des Landgerichts


(Dr. Hans Paul Tüllenber)

Kostenberechnung
Gebühr für Legalisation
(Wert DM 500,-)
JVKostO v 28.7.1987
BGBl I S. 881
20-

7

TRADUCCION OFICIAL No 5133

de un documento escrito en Alemán, el cual para su identificación se sella con el sello de la traductora, lo mismo que la presente -

(A continuación del poder conferido a GERMAN CAVELIER, tpa 832, GONZALO PERDOMO, tpa. 831, EMILIO FERRERO tpa, 31929, y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa 23555; domiciliados en la Carrera 4 No 72-35, Bogotá, Colombia, por la BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH, domiciliada en D-55216 Ingelheim am Rhein, RFA, a través de sus representantes los Srs. Dr Dieter Laudien y Dr Gerhard Huber)

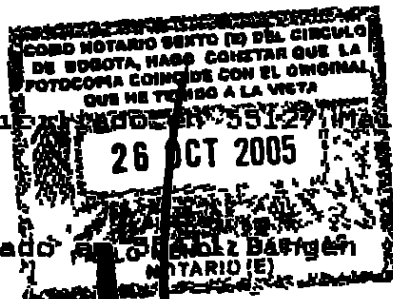
Legalización

Protocolo notarial No 2659/95 V

Certifico la autenticidad de las firmas antecedentes puestas ante mí por los señores

- 1 Dr Dieter Laudien, Dipl. Chim., domiciliado en 55127 Mainz,
- 2 Dr Gerhard Huber, abogado, domiciliado en 55127 Mainz,

a quienes conozco en persona



Igualmente certifico, por haber examinado en la fecha el Registro de Comercio del Juzgado Municipal de Bingen, HR B 1063, que la firma Boehringer Ingelheim International GmbH, domiciliada en Ingelheim am Rhein, está inscrita bajo el No HR B 1063 en el Registro de Comercio del Juzgado Municipal de Bingen y que los señores Dr. Laudien y Dr Huber, en su calidad de apoderados, están facultados para representar conjuntamente a la sociedad

Ingelheim am Rhein, 12 de diciembre de 1995/hun

Fdo : firma ilegible

(Hilo y oblea roja en relieve)

El notario suplente

El notario suplente - Ingelheim

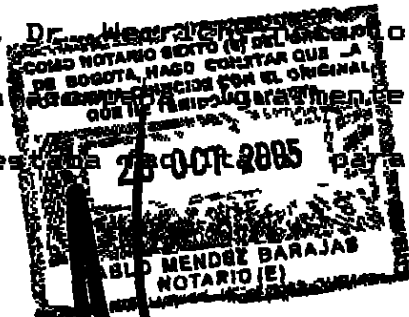
del notario de Ingelheim

Prof Dr Weirich

(dos sellos redondos en tinta del Tribunal Regional de Mainz)

910 E 1

Se certifica la autenticidad de la firma antecedente del Dr Peter Wirth, como notario suplente del Prof. Dr. Weirich, como notario de Ingelheim, y la del sello oficial que la acompaña, en la que se certifica que el mencionado notario está habilitado para realizar ese acto oficial



Mainz, trece de diciembre de mil novecientos
noventa y cinco

El Presidente del Tribunal Regional

(E) Fdo firma ilegible

(Dr Hanns Paul Tutenberg)

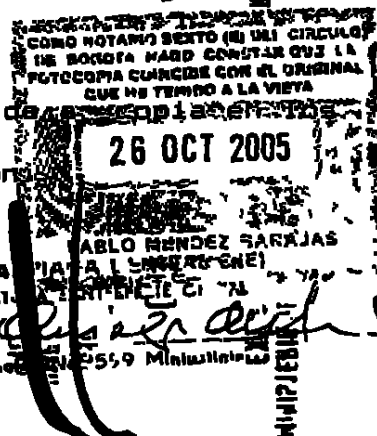
Costas

Derechos de legalización
(Valor DM 5 000,-)
JVKostO del 26 de julio 1957
Gacetas Oficial I Pag 861
DM 20,--
Mainz, 13 de diciembre de 1995
Fdo firma ilegible
Inspector

EN ESPAÑOL: La legalización de las firmas antecedentes por el
Consulado de Colombia en Munich bajo el No 159 del 10 de
diciembre de 1995, y por el Ministerio de Relaciones Exteriores
de Colombia bajo el No 051606 del 4 de enero de 1996.
Pagados derechos y Fondo Rotatorio US\$ 106,--

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se da copia a los
archivos de estas oficinas para su confrontación

Santafé de Bogotá, 6 de enero de 1996



COMO NOTARIO SEXTO ENCARGADO DE SANTAFE
DE BOGOTA HAGO CONSTAR QUE LA FIRMA DE

[Signature]

C. C. _____
COINCIDE CON LA REGISTRADA POR EL (ELLA)
EN ESTA NOTARIA

09 ENE 1996

SANTAFE D^a BOGOTA D.C.



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TERCERO

09 ENE 10 A 11 33

JEFE DE ASISTENCIAS
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

[Signature]

CUYAS FUNCIONES SON LAS DE
INTERPRETE PENAL
LAS FUNCIONES

COMO NOTARIO SEXTO ENCARGADO DE SANTAFE DE BOGOTA HAGO CONSTAR QUE LA FIRMA DE
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

26 OCT 2005

PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO SEXTO ENCARGADO

TELEFAX (57) (1) 24-9850
TELEX 43479 CAVÉ CO
(23)740 7375 CAVÉ UC

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4ª No 72-35
BOGOTÁ 8 COLOMBIA

10
CORREO ELECTRONICO MUNDIAL CAVÉ
TELEFONO (57) (1) 2120100
CABLES CAVELEYES

Señor Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E S D

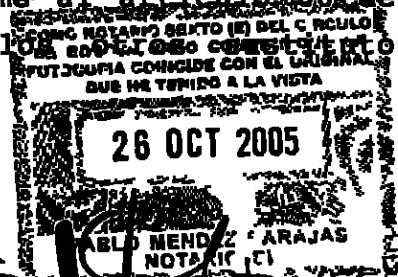
Poderdante BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

Poder conferido el 12-12-95

Yo, GERMAN CAVELIER, obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado atentamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder que me ha sido conferido en la persona del doctor EMILIO FERRERO, Abogado con Tarjeta Profesional No 31 929, con todas las facultades que me fueron conferidas

Hago la anterior sustitucion conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil ya que los requisitos que faltan en este momento

Señor Jefe,



GERMAN CAVELIER

T P A No 832

C C No 2 877 94 de Bogotá

Acepto

EMILIO FERRERO

T P A No 31 929

C C No 438 019 de Usaquén

2e-780-2

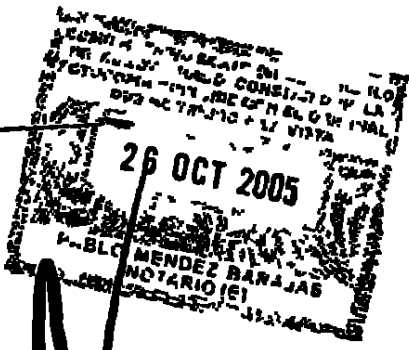
NOTARIA SEXTA DE BOGOTA
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL

Bogotá, D. C. 11 ENE 1996
Ante M^e, PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO SEXTO ENCARGADO DEL CIRCULO DE BOGOTA.
Compareció(eron) [Signature]

quien(es) exhibió(ron) a(s) 78779124
438019

y la(s) Libreta(s) Militar(es) [Signature]

domiciliado(s) en Bogotá y declararon que la(s) firma(s) que
aparecen(n) en el presente documento son la(s) suya(s) y
que el contenido del mismo es cierto.
En constancia se firma esta Diligencia.

[Signature]
[Signature]
[Signature]


CAVELIER**374**

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

CESION**ASSIGNMENT**

Yo (nosotros) abajo firmado (s)

- 1 Robert WANDL
- 2 Roman NECINA
- 3 Randolph SEIDLER
- 4 Martin LENTER
- 5 Henri DOODS

I (we), the undersigned

- 1 Robert WANDL
- 2 Roman NECINA
- 3 Randolph SEIDLER
- 4 Martin LENTER
- 5 Henri DOODS

Domiciliado(s)

en

- 1 Landstrasse/Hauptstrasse 107/101, 1030 Wien, Austria
- 2 Schillgasse 32/18, 1210 Wien, Austria
- 3 4 Lester Road Sandy Hook, CT 06482, USA
- 4 Promenade 23, 89073 Ulm, Germany
- 5 Freiherr-von-Koenig-Str 6, 88447 Warthausen, Germany

of

- 1 Landstrasse Hauptstrasse 107/101, 1030 Wien, Austria
- 2 Schillgasse 32/18, 1210 Wien, Austria
- 3 4 Lester Road Sandy Hook, CT 06482, USA
- 4 Promenade 23, 89073 Ulm, Germany
- 5 Freiherr-von-Koenig-Str 6, 88447 Warthausen, Germany

Declaro(amos) bajo juramento ser único(s) y verdadero(s)
inventor(es) de la invención **PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN FACTOR QUIMIOTACTICO MODIFICADO**
EN EL N-TERMINAL

declaro(amos) así mismo que cedo(amos) y transfiero(amos), sin
limitación a favor de la sociedad

state(s) under oath to be sole and true inventor(s) of the invention
"Method for the production of an N-terminally modified
chemotactic factor"

state as well that assign without reservations or limitations in favour
of **Boehringer Ingelheim International GmbH**

Boehringer Ingelheim International GmbH

constituida y existente de conformidad con las leyes de

Alemania

a corporation constituted and existing in conformity with the laws of

Germany

domiciliada en **Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim,**
Alemania

domiciled in **Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim,**
Germany

todos los derechos inherentes a dicha invención y que la citada
compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente de
invención correspondiente en la República de Colombia.

all rights inherent to said invention and that the above mentioned
company hereby is enabled to apply in its name, for the corresponding
patent invention in the Republic of Colombia

Dado y firmado hoy/Given and signed this

en/in

Firma/Signature

Robert WANDL**Roman NECINA****Randolph SEIDLER****Martin LENTER****Henri DOODS****© CAVELIER ABOGADOS**

WPPODE01 374

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los _____ días del mes de _____
de 200 ____ Ante mí, Notario Publico de

compareció(eron) personalmente _____

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)
persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es)
tiene(n) capacidad legal para otorgarlo

NOTARIAL CERTIFICATION (INDIVIDUAL)

On this _____ day of _____
200 ____ before me, a Notary Public of

personally appeared _____

to me known, and known to me to be the person(s) who executed
that foregoing document, and who has(have) legal capacity to
execute it.

NOTARIO PÚBLICO-NOTARY PUBLIC

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

- 1 Country
This public document
2 has been signed by
3 acting in the capacity of
4 bears the seal/stamp of

Certified

- 5 at 6 the
7 by
8 No
9 Seal/stamp 10 Signature

Urkundenrolle I Nr 472/2005

Notariat I Zeppelinring 56, 88400 Biberach
Telefon 07351/1803-10 Fax 07351/1803-60

Unterschriftsbeglaubigung:

Vorstehende, vor mir vollzogene Unterschriften von

- 1 Herrn Dr Martin Lenter,
Biochemiker,
Promenade 23, 89073 Ulm,
geboren am 17 10 1961,

-ausgewiesen durch Vorlage des Personalausweises-

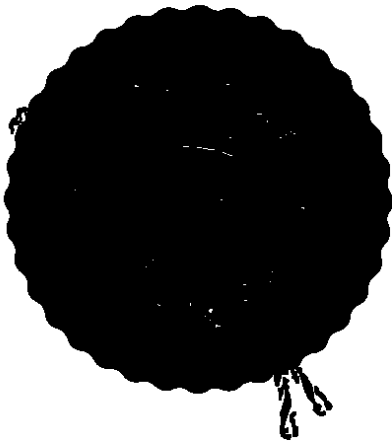
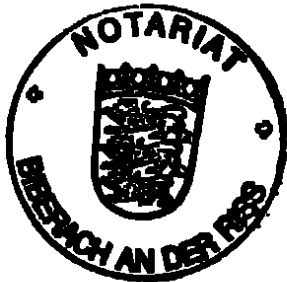
- 2 Herrn Dr Henri Doods,
Pharmakologe,
Freiherr-v -König-Str 6, 88447 Warthausen,
geboren am 03 06 1958,

-ausgewiesen durch Vorlage des Reisepasses-

beglaubige ich hiermit

Biberach, den 29 09 2005
Notariat Biberach

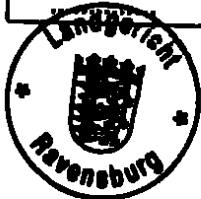
Groß
Amtsverwalter



Apostille
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1 Land Bundesrepublik Deutschland
Diese öffentliche Urkunde
2 ist unterschrieben von *Martin Lenter*
Henri Doods
3 In seiner/ihrer Eigenschaft als *öffentlicher Notar*
4 sie ist versehen mit dem Siegel/Stempel des *Notariats Biberach an der Ries*

Bestätigt
5 in Ravensburg 6 am *5. Okt. 05*
7 durch den Präsidenten des Landgerichts
8 unter Nr 910 a - *48.000,5*
9 Siegel/Stempel 10 Unterschrift *Dr Steinle*



TRADUCCION OFICIAL No 10970

de un documento escrito en Alemán, efectuada por Luz Arriaga de Herber,
resolución del Ministerio de Justicia 599 del 6 de marzo 1978 -

Traducción de los sellos y autenticaciones en alemán que aparecen a continuación
de un documento de Cesión, escrito en español e inglés, por medio del cual los
señores

- 1 Robert WANDL
- 2 Roman NECINA
- 3 Randolph SEIDLER
- 4 Martin LENTER
- 5 Henri DOODS

domiciliados en

- 1 Landstrasse Hauptstrasse 107/101, 1030 Viena, Austria
- 2 Schillgasse 32/18, 1210 Viena, Austria
- 3 4 Lester Road Sandy Hook, CT 06482, USA
- 4 Promenade 23, 89073 Ulm, Alemania
- 5 Freiherr-von-Koenig-Str 6, 88447 Warthausen, Alemania

declaran bajo juramento ser unicos y verdaderos inventores de la invención

**"Procedimiento para la preparación de un factor quimiotáctico modificado
en el N-terminal factor"**

y declaran así mismo que ceden y transfieren sin limitación a favor de la sociedad
Boehringer Ingelheim International GmbH constituida y existente de conformidad
con las leyes de Alemania, domiciliada en Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim,
Alemania, todos los derechos inherentes a dicha invención y que la citada
compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente correspondiente
en la República de Colombia Hay dos firmas ilegibles de los señores Lenter y
Doods

LUZ ARRIAGA DE HERBER
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
[Firma]
Resolución No.599 Minjusticia

Protocolo notarial I Nr 472/2005

Notaría I Zeppelingsring 56, 88400

Tel 07351/1803-10 Fax 07351/1803-60

AUTENTICACION DE FIRMA

Certifico la autenticidad de la firmas antecedentes puestas ante mí por los señores

1 Dr Martin Lenter,

Bioquímico,

domiciliado en Promenade 23, 89073 Ulm,

nacido el 17 10 1961

**- identificado mediante presentación de su cédula de
ciudadanía -**

2 Dr Henri Doods,

Farmacólogo,

domiciliado en Freiherr-v -König-Str 6, 88447 Warthausen,

nacido el 03 06 1958,

- identificado mediante presentación de su pasaporte -

Biberach, 29 09 2005

Notaría Biberach

Fdo firma ilegible

Groß

Notario suplente

(Hilo y oblea notarial en relieve)

LUZ ARRIAGA DE HOFER
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL

Resolución No 569 Minjusticia

APOSTILLE
(Convention de La Haya du 5 octobre 1961)

- 1 País República Federal de Alemania
- Este documento publico
- 2 Ha sido firmado por el notario suplente Groß
- 3 Actuando en calidad de notario público
- 4 Lleva el sello oficial de la notaría de Biberach

Certificado

- 5 en Ravensburg
- 7 por el Presidente del Tribunal Regional
- 8 bajo el No 910 a - 480/05 ✓
- 9 Sello
- Tribunal Regional de Ravensburg

8 el 5 de octubre 2005

10 Firma
Fdo ilegible
Dr Steinle

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los archivos
estas oficinas para su confrontación

Bogotá, 20 de octubre de 2005
C 2183

[Firma]
- ZARRIAGA DE HILDEB
INTERPRETE OFICIAL
Resolución No.598 Minjusticia

SECRETARIA DE JUSTICIA
BOGOTA D.C.
20 OCT 2005
15:55

SECRETARIA DE JUSTICIA
BOGOTA D.C.
20 OCT 2005
15:55

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

1 389054

ESTA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUERZAS INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

JUN 24 P 12 22

JEFE DE LEGACIONES
BOGOTA D.C.



(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
11 November 2004 (11.11.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/096850 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷ C07K 14/52,
C12N 15/19 A61K 38/19 A61P 9/00

DOODS, Henri [DE/DE] Freiherr von Koenig-Strasse 6
88447 Warthausen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen PCT/EP2004/003856

(74) Gemeinsamer Vertreter BOEHRINGER INGEL-
HEIM INTERNATIONAL GMBH Binger Strasse 173
55216 Ingelheim (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum
13 April 2004 (13.04.2004)

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart) AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW

(25) Einreichungssprache Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache Deutsch

(30) Angaben zur Priorität
03010014.3 2 Mai 2003 (02.05.2003) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von DE, US) BOEHRINGER INGELHEIM INTER-
NATIONAL GMBH [DE/DE] Binger Strasse 173, 55216
Ingelheim (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart) ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (nur für DE) BOEHRINGER INGELHEIM
PHARMA GMBH & CO. KG [DE/DE], Binger Strasse
173 55216 Ingelheim (DE)

(72) Erfinder, und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) WANDL, Robert
[AT/A1] Landstrasse Hauptstrasse 10/101 A 1030 Wien
(AT), NECINA, Roman [AT/A1] Schillgasse 32/18,
A 1210 Wien (AT), SEIDLER, Randolph [DE/US] 4
Lester Road, Sandy Hook CT 06482 (US) LENTER,
Martin [DE/DE] Promenade 23, 89073 Ulm (DE).

Veröffentlicht.
— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

WO 2004/096850 A1 (54) Title METHOD FOR THE PRODUCTION OF AN N TERMINALLY MODIFIED CHEMOTACTIC FACTOR

(54) Bezeichnung VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES N TERMINAL MODIFIZIERTEN CHEMOTAKTISCHEN
FAKTORS

(57) Abstract. The invention relates to a method for producing pyroGlu MCP 1 from recombinantly produced Gln MCP 1. According to the inventive method, Gln MCP 1 is incubated in a buffer solution having a salt concentration ranging between 10 mM and 160 mM and a pH value ranging between 2 and 7.5 at a temperature ranging between 30 °C and 80 °C until at least 90 percent of the MCP-1 are provided in the form of pyroGlu-MCP 1.

(57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von pyroGlu MCP 1 aus rekombinant hergestelltem Gln MCP 1, bei dem Gln MCP 1 bei einer Temperatur im Bereich von 30 °C und 80 °C in einer Pufferlösung mit einer Salzkonzentration im Bereich von 10 mM bis 160 mM und einem pH-Wert im Bereich von 2 bis 7.5 inkubiert wird, bis mindestens 90 % des MCP 1 in Form des pyroGlu MCP 1 vorliegen.

83967ff 209

**Method for the production of an N-terminally modified
chemotactic factor**

- 5 The invention relates to a process for preparing pyroGlu-MCP-1 from recombinantly produced Gln-MCP-1 and compositions containing pyroGlu-MCP-1 preparations

10 MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1, also known by the names monocyte chemotactic and activating factor 'MCAF', macrophage chemotactic factor 'MCF', tumour necrosis factor stimulated gene-8 'TSG-8', 'HC-11', smooth muscle cell chemotactic factor 'SMC-CF', lymphocyte derived chemotactic factor 'LDCF' as well as glioma derived chemotactic factor 'GDCF') is a member of the CC-chemokine family Human MCP-1 protein was
15 originally described in US Patent No 5,714,578 It is synthesised under natural conditions in the body (natively) as a precursor protein 99 amino acids long, which is then processed to form a peptide with 76 amino acid groups Mature human MCP-1 (hMCP-1) is a glycoprotein with a molecular weight of 14 kDa and is secreted by many types of cells, e.g. smooth vascular muscle
20 cells and endothelial cells (Leonard and Yoshimura (1990), Immunology Today 11, 97 - 101) It contains two intramolecular disulphide bridges and is O-glycosylated and sialylated when expressed natively (J Yan Ling et al (1990), Journal of Biological Chemistry, 265, 18318 - 18321)

- 25 The protein is a product of the JE gene of the chromosomal location 17q11 2-q21 1 This gene locus is also known as SCY A2 (small inducible cytokine A2) The human gene was first described in US Patent No 5,212,073 The expression of this gene may be induced by a number of cytokines, such as e.g. tumour necrosis factor alpha, but also by immunoglobulin G, for example
30 The gene sequence and further information on the gene and the gene product are available in the NCBI Data bank under Accession Number M37719 (see Table 1)

19
19

Table 1.

Human monocyte chemotactic protein gene, complete cds	
LOCUS HUMMCHEMP 2778 bp DNA linear PRI 13-MAY-1994	
DEFINITION Human monocyte chemotactic protein gene, complete cds	
ACCESSION M37719	
5	VERSION M37719 1 GI 187447
KEYWORDS monocyte chemotactic protein	
SOURCE Homo sapiens (human)	
ORGANISM Homo sapiens	
Eukaryota Metazoa Chordata Craniata Vertebrata Euteleostomi	
10	Mammalia Eutheria Primates Catarrhini Hominidae Homo
REFERENCE 1 (bases 1 to 2778)	
AUTHORS Shyy Y J LI, Y S and Kolattukudy P E	
TITLE Structure of human monocyte chemotactic protein gene and its regulation by TPA	
15	JOURNAL Blochem Biophys Res Commun 189 (2) 348-351 (1990)
MEDLINE 90290488	
COMMENT Original source text Human DNA	
FEATURES Location/Qualifiers	
source 1 2778	
20	/organism="homo sapiens"
/db_xref="taxon 9606"	
gene 598 2080	
/gene="SCYA2"	
CDS join(598 673 1472 1589,1975 2080)	
25	/gene="SCYA2"
/note="monocyte chemotactic protein"	
/codon_start=1	
/protein_id="AAA18102.1"	
/db_xref="GI 487124"	
30	translation= "MKVSAALLCLLLIAATFIPQGLAQPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLA SYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEICADPKQKWVQDSMDHLDKQTQTPKT"
exon <598 673	
/gene="SCYA2"	
/note="monocyte chemotactic protein"	
35	/number=1
exon 598 673	
/gene="SCYA2"	
/note="monocyte chemotactic protein"	
/number=1	

```
Intron      674 1471
              /gene="SCYA2"
              /note="monocyte chemotactic protein intron A"
5  exon      1472 1589
              /gene="SCYA2"
              /note="monocyte chemotactic protein"
              /number=2
intron      1590 1974
              /gene="SCYA2"
10  exon     1975 2080
              /gene="SCYA2"
              /note="monocyte chemotactic protein"
              /number=3
15  exon     1975 >2080
              /gene="SCYA2"
              /note="monocyte chemotactic protein"
              /number=3

BASE COUNT  700 a  727 c  565 g  781 t   3 others
20  ORIGIN
    1  cagttcaatg ttacacaat cctacagttc tgctaggctt ctatgatgct actatctgc
   61  atttgaatga gcaaattggt ttaatgcatt gtcaggggagc cggccaaagc ttgagagctc
  121  ctctctggct gggaggcccc ttggaatgtg gcctgaaggt aagctggcag cgagcctgac
  181  atgcttcat ctagtctct cgtctcttc ctttctctgc agtttctgct tcagagaaag
 241  cagaatcctt aaaaataacc ctctagttc acatctgttg tcagttctgg cttaatggca
 301  cccctctct cccatttgcg tcatttggc tcagcagtga atggaaaaaa gtgtctgtcc
 361  tcacccccct gcttccctt cctacttct ggaatccac aggatgtctc atttgtcag
 421  cagatttaac agcccactta tcatctatgg aagatccctc ctctgcttg actccgccct
 481  ctctccctct gcccgcttc aataagaggc agagacagca gccagaggaa ccgagaggct
 30 541  gagactaacc cagaaacatc caatttcaa actgaagctc gcactctcgc ctccagcatg
   601  aaagtctctg ccgccctct gtgcctgctg ctcatagcag ccaccttcat tcccaaggg
   661  ctgctcagc caggttaagg cccctctct tctcttgaa ccacatgtc ttctcttga
   721  gttatcatgg accatccaag cagacgttgt accacagtc ttgcittaac gctactttc
   781  caagataagg tgactcagaa aaggacaagg ggtgagcccc aaccacacag ctgtgtctg
 35 841  gcagagcctg aactagaatt ccagctgtga aoccaaacc agctctctc aggatcagg
   901  atccagctct gggaaacacac tcagcagta cccccccagc tgcttcagc agagtttggg
   961  gatcagggtt atcaagaga aggttgggtg ttaggtctgt ttccagacac gctggagacc
 1021 cagaatctgg tctgtcttc attaccta gctccagag accgttgact ctgcaggtaa
 1081 tgagtatcag ggaacatcat gaccaggcat agctattcag agtctaaaag gaggctcata
40 1141 gtggggctcc cagctgatct tccctgtgc tgatcatctg gattatttgt ccgtctaat
```

1201 gacactgta ggcattatct agctttaaca gctctcctt ctctcgtcc attatcaatg
 1261 ttatataccc cattttacag cataggaaac tgagtcattg ggtcaaagat cacattctag
 1321 ctctgaggta taggcagaag cactgggatt taatgagctc ttctctctt cctgcctgcc
 1381 ttgttttt tctcatgac tctttctgc tcttaagatc agaataatcc agttcatcct
 5 1441 aaaatgcttt tcttgtgtt ttattitca gatgcaatca atgccccagt cacctgctgc
 1501 tataacttca ccaataggaa gatctcagt cagaggctcg cgagctatag aagaatcacc
 1561 agcagcaagt gtcccaaga agctgtgatg tgagttcagc acaccaacct tccctggcct
 1621 gaagttctc ctgtggagc aagggaacag cctcataaac ctgagtcag agagtgcaat
 1681 attaaacta atgtacaaag gtcccaatg ggaataatga ggcaccaagg gaataagtga
 10 1741 accccaacat cactctcac ctgggtgctt attcagaaca cccaatttc tttagctga
 1801 agtcaggatg gctccacctg gacacctata ggagcagttt gccttgggtt cctccttcc
 1861 accctgctc tctagctc catggcagct cgttttgtt gcagaatggg ctgcactct
 1921 agaccaaac tgcaaggaa ctcatctaa ctctctcc tccctccc acagctcaa
 1981 gaccattgtg gcaaggaga tctgtctga cccaagcag aagtggttc aggttccat
 15 2041 ggaccacctg gacaagcaa ccaaatcc gaagactga acatcactc cacaaccaa
 2101 gaatctgag ctactatt tccctagc ttcccccaga cccctgtt tatttatta
 2161 taatgaatt ttttgtga tgtgaacat tatgcctaa gtaatgtaa ttctattta
 2221 agttattgt gtttaagt tatcttcat ggtactagt ttttagat acagagact
 2281 ggggaatg ctctctct tgaaccacag ttctacctt gggatgttt gagggcttt
 20 2341 gcaagaatca taatacaa gaattttt taacattca atgcattgct aaatattat
 2401 tgtggaatg aatatttgt aectattaca ccaataaat atatttgt acaaacctg
 2461 actccagt tttctgaa ggaattaca aagctgagag tatgagctg gtgtgacaa
 2521 aggaacatga tttagaggg tgggcttac atttgaagg aatgggaag tggattggc
 2581 cnnitctc ctccatggg tggctctc tgagctccg gtgaagaat cttaatggc
 25 2641 ggccagttag gcaataagc accaccttc cagtctcaa cataagcagc ccagagtcca
 2701 atgacctgg taccattt gcaagagccc accccattt ctctgtct cagacccctg
 2761 accctgcatg caattt
 //

30

It has already been explained in the above-mentioned US 5,714,578 that in
 the case of an MCP-1 protein isolated from a native source the N terminus is
 blocked. Only later was it discovered that this is due to a post-translational
 modification in which the glutamine exposed after the cleaving of the leader
 35 sequence at the N terminus of the mature protein is cyclised, losing an NH₂
 molecule, to form a pyroglutamate group

22
22

The identification of the open reading frame coding for MCP-1 in US 5,212,073 allowed recombinant expression of the protein. An MCP-1 produced by the recombinant method, e.g. in *E. coli*, does not have the typical N- or O-glycosylation pattern of the native MCP-1. An MCP-1 preparation prepared in this way also does not oppose Edman decomposition in the same way as a preparation obtained from native material, i.e. it contains unblocked N termini (glutamines). In cellular assays based on the chemotactic effect on macrophages, originally no difference could be found between the biological activity of native MCP-1 preparations and those obtained by the recombinant method.

Under physiological conditions MCP-1 acts as an agonist to the beta-chemokine receptors CCR2 and CCR4, both of which are expressed mainly on monocytes and are also found both on basophiles and on T- and B-lymphocytes. MCP-1 induces monocyte chemotaxis even at subnanomolar concentrations. The receptors CCR2 and CCR4 are G-protein-coupled seven-transmembrane domain receptors which lead to the activation of monocytes and increased adhesion of integrins. This process ultimately results in the docking of monocytes to endothelial cells and the subsequent departure of the monocytes from the vascular system.

WO 98/44953 discloses the influence of MCP-1 on arteriogenesis, i.e. the growth of collateral arteries and/or other arteries from existing arteriolar connections. On the basis of this finding it was proposed in the above-mentioned International Patent Application to use MCP-1 for therapeutic purposes, namely for the treatment of vascular occlusive diseases which may be alleviated by stimulating the formation of new blood vessels. Such vascular occlusive diseases are particularly coronary artery disease (CAD), peripheral arterial occlusive disease (PAOD), cerebral and mesenteric arterial occlusive diseases, etc. The application also proposed the use of MCP-1-neutralising agents such as e.g. anti-MCP-1-antibody for preventing new vascular formation in order to combat tumour growth, in particular, which is reliant on a sufficient blood supply and hence adequate vasculature of the tumour tissue.

23
23

In order to be able to use the MCP-1 protein as explained above in a therapeutic approach for promoting the vascularisation of tissue, large enough quantities of this protein have to be made available with sufficient purity for pharmaceutical purposes. Human MCP-1 was originally obtained in native form from cultures of the human glioma cell line U105MG or from human mononuclear leukocytes of peripheral blood. Protein intended for therapeutic purposes cannot be isolated from these sources because the production of large enough amounts would only be possible at unacceptably high cost in terms of labour and/or materials. It would not be possible to obtain human leukocytes in the required quantity. The glioma cells could indeed be replicated in virtually unrestricted amounts, but are unsuitable for cultivation in biotechnological fermenters and additionally require foetal calf serum for their cultivation, for example, with all the attendant problems.

Instead of the native expression of MCP-1 it is therefore an inviting prospect to prepare MCP-1 by the recombinant method. In fact recombinant human MCP-1 is already commercially available, particularly from Messrs R&D Systems (Catalogue no. 279-MC) and Peprotech (Catalogue no. 300-04, see Table 2, the catalogue numbers quoted are those applicable in January 2003). According to the product specification of the commercially available recombinant MCP-1 preparations the MCP-1 protein present therein contains the amino acid glutamine (Q) at the N terminus. The product description also indicates that this protein preparation is highly sensitive, particularly in the reconstituted liquid form (recommended max storage: 1 week at 4°C). In fact, experiments by the inventor (internal prior art) showed that when the conventional MCP-1 protein preparations are stored in dissolved form the – biologically active – protein preparation appears to show signs of contamination by breakdown products very rapidly, particularly at temperatures above 4 °C (appearance of secondary bands in analytical HPLC chromatographs).

29
24

Table 2 (extract from the Internet Website of Messrs Peptotech

<http://www.peptotech.com/content/details.htm?results=1&prod=1392>)

5 Recombinant Human MCAF (Human MCP-1)

Description	Human monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) also known as macrophage/monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) is an 8.6 kDa protein containing 76 amino acid residues. It plays an important role in the inflammatory response of blood monocytes and tissue macrophages.
Catalog #.	300-04
Source	E. coli
Formulation	The sterile filtered solution was lyophilized with no additives.
Stability	The lyophilized protein is stable for a few weeks at room temperature, but best stored at -20°C. Reconstituted human MCAF should be stored in working aliquots at -20°C.
Purity	Greater than 99% by SDS-PAGE and HPLC analyses. Endotoxin level is less than 0.1 ng per µg (1 EU/µg).
Reconstitution	We recommend a quick spin followed by reconstitution in water to a concentration of 0.1-1.0 mg/ml. This solution can then be diluted into other aqueous buffers and stored at 4°C for 1 week or -20°C for future use.
Biological Activity	Determined by its ability to chemoattract human monocytes using a concentration range of 5.0-20.0 ng/ml.
AA Sequence	QPDAINAPVT CCYNFTNRKI SVQRLASYRR ITSSKCPKEA VIFKTIVAKE ICADPKQKWV QDSMDHLDKQ TQTPKKT
Country of Origin	USA

A conventional method of recombinantly producing human MCP-1 protein is by the temperature-induced expression of the protein as a fusion protein, purification of the inclusion bodies formed subsequently, dissolving and

refolding of the protein and subsequent enzymatic release of the hMCP-1 protein from the fusion protein

- 5 In conventional processes for the recombinant preparation of human MCP-1 protein the problem arises that a protein which is N-terminally shortened by one or more amino acids is often obtained as a by-product. These by-products may behave as antagonists to MCP-1 receptors in biological systems
- 10 In Van Collie et al. (1998), Biochemistry 37: 12672, 12673 a process is described in connection with experiments on the influence of N-terminal modifications on the biological activity of MCP-2, wherein an MCP-2 preparation obtained by the recombinant method is incubated in 0.01 M Na_2HPO_4 , pH 8.0, for 24 hours at 37 °C. MCP-2 has 62% homology with
- 15 MCP-1 at the level of the amino acid sequence and also differs from it to the extent that N-terminally unmodified MCP-1 is biologically active, unlike MCP-2 (cf. the line "Biological Activity" in Table 2). The authors did not determine the extent of the conversion of the N-terminal glutamine groups into a pyroglutamate group which takes place under the conditions mentioned
- 20 above. The inventors have found (inter alia prior art) that the application of comparable conditions to MCP-1 in any case leads to only partial cyclisation of the N-terminal amino acid (cf. Table 3, Comparison test 2).

- One aim of the invention therefore, in the light of the foregoing discussion, is
- 25 to provide a process by which an MCP-1-preparation (MCP-1 composition) may be prepared, which (a) is suitable for therapeutic purposes in view of its biological activity and (b) has advantages in terms of the drug licensing procedures, which in the case of biopharmaceuticals contain requirements which are extremely difficult to comply with, e.g. with regard to the purity and
- 30 reproducibility of production of the pharmaceutical composition, and in particular (c) has an excellent shelf life. Another related aim is to provide compositions or preparations which contain MCP-1 produced by the recombinant method and are suitable for the purposes mentioned above or have the aforementioned advantages.

These aims are achieved by the processes and compositions containing MCP-1 recited in the claims

- 5 Thus according to the invention a process for preparing pyroGlu-MCP-1 from recombinantly produced Gln-MCP-1 is provided wherein Gln-MCP-1 is incubated at a temperature in the range from 30°C and 80°C, preferably in the range from 30°C and 70°C and more preferably in the range from 35 °C to 60°C, in a buffer solution which has a salt concentration in the range from 10 mM to 160 mM, preferably in the range from 10 mM to 100 mM, and which
10 has a pH in the range from 2 to 7.5, preferably 3.5 to 7.5, more preferably 3.5 to 6.5, more preferably 5 to 6.5, more preferably 5.5 to 6.5 and more preferably has a pH of about 6. The incubation is carried out until at least 90%, preferably at least 95 % and more preferably at least 96 % of the MCP-1
15 contained in the incubating buffer solution is present in the form of the pyroGlu-MCP-1

- By "MCP-1" is meant, within the scope of this disclosure, the MCP-1 protein (without preprosequence), with an N-terminal glutamine group ("Gln-MCP-1",
20 of the amino acid sequence shown in Table 1 and Table 2) or with an N terminus which has already been converted/cyclised into the pyroglutamate group ("pyroGlu-MCP-1"), depending on the context. It is clear, however, that modifications of the MCP-1-protein which do not affect its biological function (esp. the monocyte-attractant activity or the effect on the CCR receptor) and
25 do not alter its structure so that the reaction parameters described above no longer produce the desired result (i.e. the protein can no longer be converted into a pyroGlu-Variant by the process according to the invention), do not depart from the scope of protection. Thus, the process according to the invention is naturally also applicable to an MCP-1 in which a conservative
30 amino acid exchange, e.g. serine to threonine or leucine to isoleucine, has taken place, provided that this affects neither the biological function or activity of the resulting protein nor the convertibility of the N-terminal glutamine into pyroglutamate according to the above process. The process according to the

invention can thus also be applied to MCP-1 proteins of other mammals such as e g rats, mice, guinea pigs, rabbits and ferrets (and several others)

5 The buffer solution in which the process described above is carried out is preferably a phosphate-buffered (sodium and/or potassium phosphate-buffered) aqueous solution of low or physiological molality, namely in the range from 10 to 160 mM, 10 to 80 mM, 10 to 50 mM, 20 to 40 mM or around 20 or 40 mM. If longer incubation times are accepted, according to one particular embodiment of the invention the work may also be done at 10 physiological molalities, such as e g a saline concentration of around 150 mM, this molality preferably being achieved by the use of a phosphate-buffered saline solution or "PBS". The disadvantage of the longer incubation period – and the attendant risk of increasing amounts of breakdown, secondary or oxidation products – is made up for in this particular 15 embodiment by the advantage of being able to obtain the protein preparation straight away in the form of a solution with a physiological salt concentration

The buffer solution in which the modification step is carried out may also contain, for example, a (mild) detergent, an antioxidant, a preservative, a 20 complexing agent, stabilisers, antimicrobial reagents, etc

The incubation temperature is selected in the range from 30 °C to 80 °C, i e above ambient temperature. At lower temperatures the conversion step proceeds very slowly. In order to achieve virtually total conversion the 25 incubation period would have to be increased substantially to more than a week. This would lead to stand times which are unacceptable in the biotechnological process and would also substantially increase the risk of other forms of contamination of the protein solution (with breakdown or oxidation products, bacteria, viruses or other pathogens). On the other hand, 30 although increasing the incubation temperature to above 80 °C does indeed greatly speed up the reaction of conversion, it also results in an increased formation of undesirable by-products and breakdown products (cf Examples 1 and 2). If stand times of up to 6 days are acceptable, an incubation temperature of 35 to 40 °C is particularly preferred. In cases where incubation

should be significantly shorter if possible, the incubation may also be carried out in the range from e.g. 50 to 60, 70 or 80 °C. Temperatures between 40 and 50 °C will naturally also produce the desired results.

- 5 The pH of the incubating buffer solution should be in the range from 2 and 7.5, i.e. in the neutral to acidic range. It is preferably in the range from 3.5 to 7.5, more preferably in the range from 3.5 to 6.5, more preferably in the range from 5 to 6.5, more preferably in the range from 5.5 to 6.5 and more preferably a pH of about 6 is selected.

10

With a suitable choice of the above parameters, e.g. as described in the Examples, the pyroGlu-MCP-1 variant may be obtained with a purity of 90% in any case and possibly higher, e.g. 95%, 96% or 98%, this percentage indicating the amount of pyroGlu-MCP-1 (determined e.g. as the area under the curve in an HPLC elution profile) based on the amount of total MCP-1 present in the solution (i.e. including any remaining amount of Gln-MCP-1 and possible oxidation products and other by-products or breakdown products).

15

According to another embodiment of the invention a process for preparing a pyroGlu-MCP-1 preparation is provided which comprises at least the following steps:

20

- preparing a Gln-MCP-1 preparation by the recombinant method by expression of a gene construct coding for MCP-1 in a host cell,
- optionally concentrating and/or purifying the Gln-MCP-1 contained in the Gln-MCP-1 preparation, and finally

25

- converting the Gln-MCP-1 which is contained in the Gln-MCP-1 preparation or which was contained therein before the concentrating and/or purifying, into a pyroGlu-MCP-1 preparation which contains the protein molecule species pyroGlu-MCP-1, this step being carried out according to the "Process for preparing pyroGlu-MCP-1 from recombinantly produced Gln-MCP-1" as described above.

30

This process may optionally also include, for example, buffering the pyroGlu-MCP-1 preparation or further purification, e.g. by a subsequent step of column chromatography, dialysis, ultrafiltration, etc.

Methods of producing recombinant proteins by biotechnology are known. They comprise, in particular, fermentation, purification, concentration, and other steps. The step of conversion described above may be included at various points in a "multi-step process", i.e. with an as yet largely unpurified or wholly purified MCP-1 protein solution as the starting solution. It is also conceivable, in particular, to have a process in which not yet (totally) converted Gln-MCP-1 in more, less or practically wholly purified form is lyophilised in order to improve its shelf life in as yet unconverted form and is in due course put back into solution and then converted into pyroGlu-MCP-1 according to the above process. Naturally, the protein solution obtained after conversion into pyroGlu-MCP-1 may also be lyophilised.

The product of the process, namely the pyroGlu-MCP-1 preparation subjected to N-terminal modification (conversion), contains according to the invention an amount of pyroGlu-MCP-1 of at least 90 %, preferably at least 95 % and more preferably at least 96 %, based on the total content of MCP-1 (converted plus unconverted protein plus by-products formed by oxidation, for example).

The term (Gln- or pyroGlu-MCP-1-) preparation means that in the various stages of the process the MCP-1 protein is present in dissolved form in a (buffer) solution and hence other components may be present in addition to the MCP-1, i.e. in any case the ions of the buffer salt used and possibly also other salts, antioxidants, stabilisers, antimicrobial reagents, detergents, preservatives, complexing agents, etc.

According to a further aspect of the invention a composition is provided which contains pyroGlu-MCP-1 or a pyroGlu-MCP-1 preparation obtained by the processes described above, in which at least 90 % of the MCP-1 contained in the composition (converted plus unconverted protein plus by-products, i.e. the "area under the curve" in an HPLC elution chromatograph, for example) are present in the form of the pyroGlu-MCP-1.

Thus, the invention also relates to an MCP-1 preparation produced by the recombinant method particularly in prokaryotes and particularly preferably in *E coli*, wherein at least 90 % of the MCP-1 protein is present as pyroGlu-MCP-1. When prepared in common expression cells the protein will frequently not exhibit the natural glycosylation pattern - unlike in native production. When prepared in prokaryotes such as e.g. *E coli*, in particular, the pyroGlu-MCP-1 obtained or the pyroGlu-MCP-1 preparation obtained unlike the form which occurs in native expression in the human body will not be glycosylated and/or sialylated and will thus differ from a native protein of this kind or from a protein preparation obtained from a native source.

A composition of this kind according to the invention may be, in particular, a medicament or a pharmaceutical composition which contains, in addition to an amount of pyroGlu-MCP-1 which makes up at least 90 %, 95% or 96% of the total MCP-1 content (converted plus unconverted protein plus by-products), conventional excipients and carriers, salts, antioxidants, stabilisers, antimicrobial reagents, detergents, preservatives, complexing agents, etc. The composition according to the invention may be used to treat patients suffering from an arterial occlusive disease such as in particular PAOD or CAD. The treatment comprises administering such a composition in a therapeutically effective amount by a suitable route, e.g. by intraarterial infusion or in the form of a periaarterially deposited gel, from which the MCP-1 protein is released over a fairly long period.

Surprisingly it has also been found that, contrary to expectations, the incubation of a recombinantly prepared MCP-1 protein preparation in aqueous solution and at elevated temperature does not lead to its decomposition and biological inactivation, on the contrary, with a suitable choice of a number of parameters, this step, which is very unusual from a biotechnological point of view and is usually inherently undesirable, results in a surprisingly homogeneous, biologically fully active pyroGlu-MCP-1 preparation, which retains its homogeneity even during lengthy storage, i.e. is more stable than the Gln-MCP-1 (starting) preparation.

Bodies such as the Food and Drug Administration in the USA or the EMEA in Europe make the granting of marketing approval for a drug dependent on meeting numerous conditions which are imposed on the drugs manufacturers with the ultimate aim of protecting the patient. Thus, the manufacturer in question has to supply proofs which demonstrate, for example, the purity of the pharmaceutical product, its shelf life and its reproducibility of production. These three aspects are only a small selection, but play a central role precisely in the licensing of biopharmaceuticals, i.e. drugs which contain macromolecular active substances consisting of natural materials or derived therefrom (proteins, nucleic acids, proteoglycans, polysaccharides, etc.). Often, the requirements imposed on the (bio)pharmaceutical within the framework of this approval are very difficult to meet. For example, active substances based on a protein have to be subjected to intensive and complicated multi-stage purification after their production in a more or less complex cellular organism and must not be uncontrollably altered in structure, e.g. by oxidation or other spontaneous chemical reactions. Moreover, the end product should have a reasonable shelf life so that there is no need for complicated and expensive supply networks between the manufacturer and the prescribing doctor or patient or the clinic using the product – a requirement which is generally only met with great difficulty, particularly in the case of proteins, where it is important to maintain the correct secondary structure (folding).

In the case of the MCP-1 protein the quality of commercially obtainable preparations is frequently adequate in many respects for *in vitro* testing, for example. However, the inventors have found in the course of their work that the same preparations are by no means suitable for producing a drug which would be eligible for approval. Being left to stand in solution at ambient temperature even for a short time before being administered to the patient, which could not be ruled out in doctors' surgeries or hospitals, for example, leads to the occurrence of "breakdown" products in the MCP-1 preparations which were originally viewed as contamination, in the experience of the inventors. More intense purification of the Gin-MCP-1 originally provided as active substance briefly restored a high level of purity, but even this

preparation was again unstable when briefly stored in solution and at ambient temperature. Operating a drug approval procedure on the basis of such an unstable active substance preparation is beset by tremendous problems, if not altogether hopeless.

5

Surprisingly, these problems can be overcome by the teaching of the invention, wherein an unusual and at first sight highly counter-productive step, namely incubation at elevated temperature (which was previously seen to positively promote inhomogeneity) was included in the actual preparation and purification process. In fact, when carried out under the conditions analysed in detail and perfected by the inventors, such incubation may bring about virtually quantitative conversion of the original active substance Gln-MCP-1 into the pyroGlu-MCP-1 form which was originally regarded as a contaminant. This latter form is then astonishingly stable against protein-denaturing influences such as incubation at elevated temperature and the like. Thus, an MCP-1 preparation is obtained which, by virtue of its high purity and homogeneity, exceptionally reproducible manufacture and stability on storage, is suitable for use as a pharmaceutical active substance which has good prospects of complying with the strict requirements in corresponding licensing procedures referred to earlier, and thus makes it possible to implement new therapeutic processes based on the activity of MCP-1.

According to a partial aspect of the invention a pyroGlu-MCP-1 preparation prepared by the process described above and in the claims is used

- for the therapeutic treatment of vascular occlusive diseases such as, in particular, coronary artery disease (CAD), peripheral arterial occlusive disease (PAOD), cerebral and mesenteric arterial occlusive diseases, or
- for preparing a pharmaceutical composition for the treatment of vascular occlusive diseases such as, in particular, coronary artery disease (CAD), peripheral arterial occlusive disease (PAOD), cerebral and mesenteric arterial occlusive diseases.

The invention thus also makes it possible to carry out a process for treating a patient suffering from the above-mentioned vascular occlusive diseases,

wherein the pyroGlu-MCP-1 preparation prepared by conversion or the pharmaceutical composition prepared using a pyroGlu-MCP-1 preparation of this kind is administered by injection or infusion, for example

- 5 With regard to the individual optimised process parameters it should also be noted that the biotechnologist will not easily be convinced that he or she should incubate a protein preparation for a fairly long period of, in some cases, several days at elevated temperatures of e.g. 60°C. Regarding the neutral to acidic pH of the incubating solution which was previously disclosed
- 10 as optimum this is contrary to chemical logic: the conversion of glutamine to cyclic pyroglutamate is a nucleophilic substitution reaction in which a pair of free electrons acts on the attacking nitrogen atom of the C-alpha-amino group of the glutamate at the C atom of the C-gamma-amide group. An acidic pH would inherently lead to increased protonation of the C-alpha-amino group
- 15 and would therefore have a negative effect on the speed of the reaction. However, this is precisely not the case, according to the inventors' findings. One possible explanation - which should not be interpreted restrictively - might be that the folded MCP-1 protein forms a micro-environment for the N terminus, in which in spite of the acidic pH of the surrounding aqueous
- 20 solution the amino group is present in unprotonated form, i.e. a pair of free electrons is available for the nucleophilic attack.

Examples

Example 1 Production of a pyroGlu-MCP-1 preparation by the process according to the invention

Fermentation

The fermentation was carried out with a strain of *Escherichia coli* K12 (W3110) The strain was transformed with a ColE1 plasmid (pBR322 derivative) containing the following elements the genomic sequence of hMCP-1 under the control of an all-purpose promoter (phosphatase, pPhoA), a ColE1-replication origin and the resistance gene for tetracycline For fermentation the production strain was precultured in the shaking flask in LB medium containing tetracycline Incubation was carried out at 37°C until an OD of 1 was achieved The preculture was transferred into the fermenter and further cultivated with stirring and with a supply of air at 37°C The medium contained glucose, various salts, trace elements, yeast extract, amino acids and tetracycline The pH was maintained at 6.8 with ammonia As soon as the glucose put in had been used up the dissolved oxygen (pO₂) was kept constant at the intended level of 40% by the supply of glucose The induction of the phosphatase promoter took place automatically as soon as the phosphate in the medium had been exhausted After 39 hours the biomass was harvested with a tube centrifuge (CEPA) and stored at -70°C

Cell lysis and protein purification steps

The frozen cell pellet was resuspended in four times as much lysis buffer (200 mM Tris, 55 mM NaCl, 5mM EDTA, pH 7.5) using an Ultraturrax The cell lysis was carried out by two passages with a homogeniser at 460 bar Cell fragments were removed with a CEPA centrifuge The supernatant was optionally filtered with Polysep II (1.2 µm) filters (Millipore), and then loaded onto a column combination consisting of a Q sepharose FF and an SP sepharose FF The columns were equilibrated with lysis buffer

After the loading was complete the column combination was washed with lysis buffer and the Q sepharose column was clamped off. The SP sepharose was washed with lysis buffer, then with 5 M urea (in lysis buffer) and with lysis buffer again. The product was eluted in a linear NaCl gradient.

5

The eluate was salted with ammonium sulphate to a final concentration of 1.3 mol/L and centrifuged for 15 min at 3200 g. The supernatant was loaded onto a phenyl sepharose column which was equilibrated with 1.3 M ammonium sulphate (in lysis buffer).

10

The flow of phenyl sepharose was applied to a Source 30 RPC column which was equilibrated with lysis buffer. Washing was then carried out with lysis buffer, water and buffer A (5% EtOH, 0.1% TFA). The product was eluted in a linear gradient from 20% buffer B (95% EtOH, 0.1% TFA) to 70% buffer B in

15 10 column volumes

Conversion step

The eluate was diluted 1:10 in different buffers, e.g. phosphate buffer, 10 - 40 mM, pH 6.0 - 7.4. According to a preferred embodiment a value of between 6.0 and 6.5 was sought as the final pH of the conversion solution. The protein concentration was between 0.2 and 1.0 mg/mL.

20

The solution was filter sterilised and incubated at temperatures of 35 - 80°C (in different batches) with gentle agitation (60 rpm). The progress of the reaction was monitored by HPLC analysis.

25

Final purification steps.

As soon as the end of the reaction was reached, the conversion solution was loaded onto an SP sepharose HP column which was equilibrated in buffer A (40 mM phosphate, pH 6.0). Elution was carried out with a linear NaCl gradient. The NaCl concentration in the eluate was about 350 mmol/L, and the protein concentration was about 3 mg/mL. The eluate was diluted with buffer A to a conductivity corresponding to 250 mM NaCl. Then it was further diluted with 40 mM phosphate, pH 6.0, 250 mM NaCl until the protein concentration

30

was 1 mg/mL. The bulk solution thus formed was filter sterilised and stored at 4°C or -70°C until ready to be formulated.

Analysis

- 5 The progress of the conversion step discussed above was monitored by RP-HPLC. Chromatographs of the elution profiles were taken before the start of the conversion reaction (t_0) and at times $t = 24$ h, $t = 48$ h and $t = 120$ h. As can be seen from the four chromatographs shown in Fig. 1, after 48 h approx 90 % of the protein had been converted into pyroGlu-MCP-1 at an incubation
- 10 temperature of 35 °C. HPLC analyses showed that the two disulphide bridges had formed properly.

- Fig. 2 shows the kinetics of the reaction of Gln-MCP-1 to pyroGlu-MCP-1 under the conditions described. It shows that as the duration of the reaction
- 15 increases an impurity appears, which is referred to as "variant 2" in Fig. 2 and not further characterised.

- Similar reaction patterns were observed when carrying out the conversion step in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5, or 0.1 M sodium citrate buffer, pH
- 20 3.5 (data not shown).

- The reaction described above was repeated except that temperatures of 24°C, 60 °C and 80 °C were used instead of a reaction temperature of 35°C. As is clear from the data assembled in Table 3, no satisfactory yields of
- 25 pyroGlu-MCP-1 were obtained at 24°C within a reasonable time. At 60°C and 80°C, on the other hand, significantly higher reaction rates are observed. The reaction rate at 80°C was approximately 50 times the rate at ambient temperature.

Table 3

	temperature [°C]	speed constant [1/h]	half-life [h]	time	purity [%]
Comparison test 1 20 mM phosphate pH 6.0	24	0.031	22.4	7.5 d	n.d.
20 mM phosphate pH 6.0	35	0.089	7.8	2.8 d	96.6
20 mM phosphate pH 6.0	60	0.660	1.1	8.8 h	95.0
20 mM phosphate pH 6.0	80	1.670	0.4	3.2 h	91.3
20 mM phosphate pH 6.0 150 mM NaCl	35	0.041	16.9	5.6 d	n.d.
20 mM phosphate pH 6.0 5% EtOH	35	0.108	6.4	2.1 d	95
Comparison test 2 20 mM phosphate pH 8.5	35	0.037	18.7	6.2 d	n.d.
PBS Tween 3.5% EtOH, 0.01% TFA pH 7.4	35	0.040	17.3	5.7 d	95

n.d. = not determined the end of the reaction had not been reached after the specified time

5 Certainly, a higher reaction temperature favours the formation of by-products or breakdown products, reducing the purity level - particularly when the test is carried out at 80 °C (Table 3)

10 Fig. 3 shows in high resolution the chromatographs of the elution profile of pyroGlu-MCP-1 preparations which were obtained under the conditions summarised in Table 3 (20 mM phosphate buffer, 35°C, 60°C or 80°C). As can be seen from this, significantly more impurities occur with MCP-1 by-products or breakdown products at high temperatures, even with a short incubation period (e.g. 3 hours at 80°C), than during five days' incubation at
15 35°C

The content of (e.g. 5 %) ethanol (EtOH) in certain embodiments of the process resulting from the production method did not have a negative effect

on the reaction rates or purity of the product, under otherwise constant test conditions (20 mM phosphate buffer, pH 6.0)

Example 2 Production of a pyroGlu-MCP-1 preparation by an alternative process according to the invention

The fermentation, cell lysis and protein purification steps were carried out as explained in Example 1

10 Conversion step

The eluate of the Source 30 RPC was diluted 1:10 with PBS, 0.02% Tween 20. The protein concentration was then between about 0.2 and 0.5 mg/mL, the pH was about 7.4. In addition to the buffer components the solution contained about 3.5% EtOH and 0.01% TFA, which originated from the eluate of the previous Source 30 RPC step. The solution was filter sterilised into polypropylene flasks with a Millipak 20 (0.2 µm, Millipore) and incubated at 35°C with gentle agitation. The progress of the reaction was monitored by HPLC analysis. As soon as the end of the reaction was reached the conversion solution was ultrafiltered with a Pellicon 2 UDF membrane (3k, Millipore) against PBS, 0.02% Tween 20, and the protein concentration was adjusted to 0.1 mg/mL. The preparation was decanted in 1 mL batches into glass containers through a Millipore GV filter (0.22 µm) under sterile conditions.

25 Analysis

The progress of the conversion step was monitored by RP-HPLC. As can be seen in Fig. 4, after 5 days more than 90 % of the protein had been converted into pyroGlu-MCP-1, while surprisingly in spite of the long incubation period a very high purity of 95 % was obtained (Table 3). As is apparent from a comparison of mixtures containing 20 mM phosphate buffer and those containing 20 mM phosphate buffer plus 150 mM salt (Example 1, Table 3, line 3 to line 6), the relatively low speed constant in mixtures containing PBS as incubation solution may be put down to the higher salt concentration, ionic strength or osmolarity.

31
3A

Example 3 Preparation of a pharmaceutical composition based on the MCP-1 preparation produced according to Example 1 or Example 2

- 5 The pyroGlu-MCP-1 preparation obtained in Example 1 or Example 2 was diluted to a concentration of 0.1 mg/mL in PBS (sodium chloride, disodium hydrogen phosphate, potassium chloride, potassium dihydrogen phosphate, pH 7.0), also containing 0.02 % Tween 20, and transferred into glass
10 containers in volumes of 1 mL. The finished pharmaceutical solution was clear, colourless and odourless and can be administered by injection or infusion.

Example 4 Comparison of the biological activity of pyroGlu-MCP-1 and Gln-MCP-1

15

Measuring principle

- MCP-1 binds to and activates the MCP-1 receptor CCR2b. The activation of the receptor leads to an influx of calcium into the cytosol. This can be
20 measured using a Fluorescence Imaging Plate Reader (FLIPR, Molecular Devices). To do this, the inactive fluorescent dye ester Fluo-4 AM is sluiced into cells which express hCCR2b on their surface, this ester then being cleaved by intracellular esterases. In this form the fluorescent dye binds Ca^{2+} ions. On excitation with a wavelength of 488 nm there is an emission with a
25 peak at 528 nm. The intensity of the emission is dependent on the concentration of calcium in the cytosol. The change in intensity of the emitted light thus correlates with the concentration of calcium in the cytosol which is in turn dependent on the state of activation of the receptor.
- 30 A characteristic time-triggered measuring signal after the addition of MCP-1 is shown in Fig. 5. It is apparent from this that after the addition of MCP-1 there is a rapid release of calcium which is linked with a sharp rise in fluorescence. The peak (b) is reached just a few seconds after the application (a). The

40
40

interval between the application (a) and maximum stimulation (b) is roughly 20-30 sec

- 5 In the tests that follow, the evaluation was carried out using the maximum values as they are less affected by secondary effects such as e.g. a calcium-induced calcium influx, and therefore more precise measurement is possible

Preparation of stably expressing CHO/hCCR2B-K1 cells

- 10 The coding region of the human CCR2b receptor (Gene bank Accession No D29984) was amplified by PCR. Then the 1.08 kb BamHI-XbaI fragment was cloned into an expression vector. CHO-K1 cells were transfected with this plasmid acting as an expression vector.
- 15 The cells were cultivated in a culture medium based on Ham's F12 medium and regularly passaged. On the day before the measurement 5000 cells were plated out in 384-well assay plates (Corning Costar) with 40 µl of culture medium and left to adhere overnight (approx. 24 h) at 37 °C, 5 % CO₂, 95 % relative humidity. In all the assays the measurements were carried out four
- 20 times

- On the day of the test, first of all the substance plates were prepared. Hanks buffer with 0.1 % BSA (protease-free) was used as the diluting buffer for the various MCP-1 preparations. Hanks buffer with 0.1 % BSA was used as the
- 25 blank control. Then 40 µl / well of Fluo-4 dye medium were added to the cells and the preparations were incubated for 45 min at 37 °C, 5 % CO₂, 95% relative humidity. The stained cells were then washed four times with 60 µl washing buffer, leaving a residue of 25 µl of washing buffer in each well. The cells were then incubated with washing buffer for a further 5 min at ambient
- 30 temperature

To measure the fluorescence the FLIPR measuring device was adjusted so that stained and unstained wells differed by at least a factor 1.5 and the

stained wells had approx 11,000 fluorescence counts The other FLIPR settings were

- Excitation 488 nm
- Emission 510 – 570 nm (band pass)
- 5 Negative correction Hanks/BSA (= companson with blank control)
- Bias subtraction 6 (= levelling all the wells to 0 before adding the substance)
- Presoak of the tips with 25 µl of the relevant substance solution from the substance plate (= minimising an adhesion artefact)
- 10

The measuring process comprised the following steps

- 6 intervals in a 5 sec cycle
- 15 µl substance added
- 15 60 intervals in a 1 sec cycle
- 18 intervals in a 5 sec cycle

For evaluation the maximum signal of the 78 intervals after the addition of the substance was used The control mixtures used were

- 20 blank control for negative correction
- positive control (ATP) for checking the staining
- reference control (standard) -monitorng the receptor expression on the cells
- basis of calculation for determining the activity of unknown samples
- 25

The samples to be tested were pipetted parallel with the reference control in identical dilution steps The concentrations used in the tests were selected so as to be in the EC₅₀ region of the reference control

30

Comparison of MCP-1 preparations according to the invention and not according to the invention

Two pyroGlu-MCP-1 preparations ("Batch 071100kh" and "Batch 0141921") prepared by the process according to the invention and an MCP-1 preparation prepared by the recombinant method, whose N-terminal glutamine group had not been converted into a pyroglutamate group in the process step according to the invention as described above (MCP-1 preparations obtainable from Peptotech) were tested and compared using the test system described previously. The EC₅₀ was determined from the measurement curves recorded as described above (see Fig. 6).

Virtually identical EC₅₀ values were obtained for the two pyroGlu-MCP-1 preparations, while the values for the MCP-1 preparation not according to the invention and not N-terminally modified differed significantly (Fig. 6). The EC₅₀ value of the latter preparation proved to be worse by a factor 2 to 3 (pyroGlu-MCP-1 EC₅₀ = 7.82 nM, MCP-1 preparation from Peptotech EC₅₀ = 20.76 nM).

The biological activity of the two preparations was calculated as follows.

First, a positive correction is made to the pyroGlu-MCP-1 at the concentration 1e-8 M, i.e. the value obtained at a concentration of 10 nM pyroGlu-MCP-1 was set at 100 %. This is in the almost linear part of the ascent of the curve. Using this percentage signal the activity of other preparations, such as e.g. the Peptotech MCP-1, is calculated according to the formula:

$$\% \text{ activity}_{(\text{sample})} = \text{RFU}_{(\text{sample at } 1\text{e-}8\text{M})} \times 100 \% / \text{RFU}_{(\text{standard at } 1\text{e-}8\text{M})}$$

In the above Example, as shown in Table 4, this yields a value of 48 % activity for the non-N-terminally modified MCP-1 preparation based on the pyroGlu-MCP-1 preparation.

Table 4

measured val (neg corr. Hanks/BSA, bias subtraction 6)				
	value 1	value 2	value 3	value 4
pyroGlu MCP-1 (071100kh) at 1e-8M	12137 63	13919 36	12286 6	13249 68
MCP-1 (Peprrotech) at 1e-8M	6216 81	6125 89	6636 11	5425 31

	average	SD
pyroGlu MCP-1 (071100kh) at 1e-8M	12898 3	727 8
MCP-1 (Peprrotech) at 1e-8M	6151 0	500 2

% activity_{(MCP-1 (Peprrotech))} = 6 6151 x 100% / 12898 3 = 48 % activity

5 Example 5. Temperature sensitivity of pyroGlu-MCP1

pyroGlu-MCP-1 was incubated for 1 or 2 hours at 56°C or 95°C The biological activity still present thereafter was then measured using the test system in Example 4

10

It was found that no denaturing occurs when a pyroGlu-MCP-1 preparation is incubated at 56 °C for either one hour or two hours However, as shown in Fig 7, incubation at 95°C results in a very marked denaturing effect

15 Example 6 Treatment of patients suffering from an arterial occlusive disease

For treating PAOD patients a pyroGlu-MCP-1 preparation as prepared above is adjusted to a concentration of between 1 2 and 120 µg/ml Immediately before use this solution is adjusted to a final concentration of between 0 1 and 10 µg/ml and infused into the patient at a flow rate of 2 to 12 ml/min over a period of 1 to 6 hours by intraarterial route close to the region affected by the vascular occlusion The infusion may be repeated after 1 to 7 days

20

Patent Claims

- 1 **Process for preparing pyroGlu-MCP-1 from recombinantly produced Gln-MCP-1, wherein Gln-MCP-1 is incubated**
- 5 - at a temperature in the range from 30°C and 80°C
- in a buffer solution with
- a salt concentration in the range from 10 mM to 160 mM and
- at a pH in the range from 2 to 7.5
- until at least 90 % of the MCP-1 is present in the form of the pyroGlu-MCP-1
- 10 **MCP-1**
- 2 **Process according to claim 1, wherein the buffer solution is a phosphate buffer with a concentration in the range from 20 mM to 50 mM and with a pH in the range from 3.5 to 6.5**
- 15 **3 Process according to one of Claims 1 or 2, wherein the buffer solution additionally contains a detergent, an antioxidant, a preservative, a stabiliser, an antimicrobial reagent and/or a complexing agent**
- 20 **4 Process for preparing a pyroGlu-MCP-1 preparation, comprising at least the steps of**
- preparing a Gln-MCP-1 preparation by expression of a gene construct coding for MCP-1 in a host cell,
- optionally concentrating and/or purifying the Gln-MCP-1 contained in
- 25 the Gln-MCP-1 preparation,
- converting the Gln-MCP-1 of the Gln-MCP-1 preparation into a pyroGlu-MCP-1 preparation which contains pyroGlu-MCP-1, according to one of processes 1 to 3, and
- optionally buffering and/or further purifying the pyroGlu-MCP-1
- 30 preparation,
- the proportion of pyroGlu-MCP-1 based on the total content of MCP-1 in the resulting pyroGlu-MCP-1 preparation being at least 90%

- 5 **5** Composition containing a pyroGlu-MCP-1 preparation prepared according to claim 4, wherein at least 90 % of the MCP-1 contained in the pyroGlu-MCP-1 preparation is present in the form of the pyroGlu-MCP-1
- 5 **6** Process for preparing a pharmaceutical composition containing pyroGlu-MCP-1, wherein a pyroGlu-MCP-1 preparation prepared according to claim 4 is used
- 10 **7** Medicament or pharmaceutical composition containing a pyroGlu-MCP-1 preparation prepared according to claim 4, wherein at least 90 % of the MCP-1 contained therein is in the form of the pyroGlu-MCP-1
- 15 **8** Medicament or pharmaceutical composition according to claim 7, containing pyroGlu-MCP-1 in a phosphate buffer with sodium chloride and optionally a detergent as additives
- 20 **9** Use of pyroGlu-MCP-1 or a pyroGlu-MCP-1 preparation prepared according to claim 4 for preparing a pharmaceutical composition for the treatment of vascular occlusive diseases such as, in particular, coronary artery disease (CAD), peripheral arterial occlusive disease (PAOD), cerebral and mesenteric arterial occlusive diseases
- 25 **10** Recombinant MCP-1 preparation produced by the process according to claim 4, the biological activity of which, with respect to a recombinantly produced MCP-1 preparation which has not been subjected to a process according to claim 1 (N-terminally unmodified MCP-1 preparation), is in the ratio 100 : 48 or higher
- 30 **11** Recombinantly produced MCP-1 preparation, wherein at least 90 % of the MCP-1 protein is present as pyroGlu-MCP-1

12 MCP-1 preparation according to claim 11, wherein the pyroGlu-MCP-1 is present in non-glycosylated form

13 Process for inducing a biological or physiological reaction which
5 substitutes for or potentiates the biological or physiological activity of endogenous native MCP-1-protein, characterised in that a composition according to claim 5 or a pharmaceutical composition according to claim 7 or a preparation according to at least one of Claims 10 to 12 is added
10 to cells or tissues or organs in an amount which is suitable for evoking the biological or physiological activity

14 Process according to claim 13, wherein the cells or tissues or organs comprise CCR-2 and/or CCR-4-receptors

15 **15** Process according to claim 14, wherein the cells are mammalian cells which natively or recombinantly express the MCP-1 receptor subtype CCR2, particularly CCR2b

20

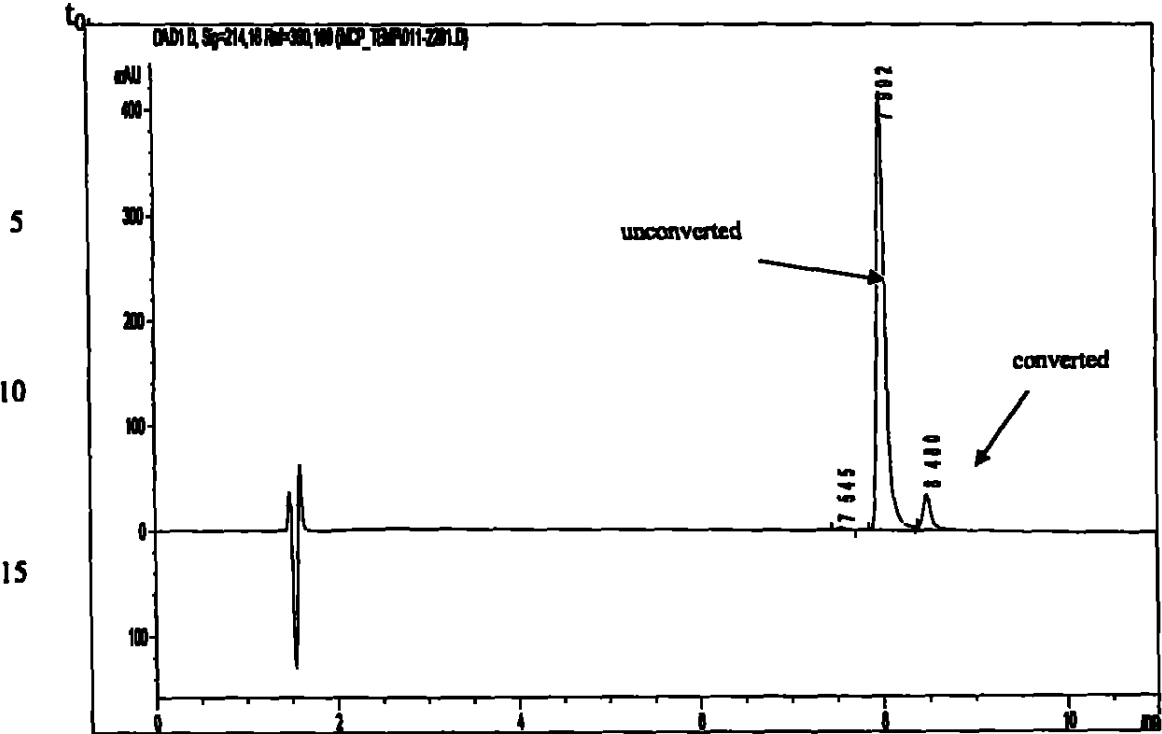
25

30

Abstract

The invention relates to a process for preparing pyroGlu-MCP-1 from
recombinantly produced Gln-MCP-1, wherein Gln-MCP-1 is incubated at a
5 temperature in the range from 30°C and 80°C in a buffer solution with a
salt concentration in the range from 10 mM to 180 mM and a pH in the
range from 2 to 7.5, until at least 90 % of the MCP-1 is present in the form
of the pyroGlu-MCP-1

1/8



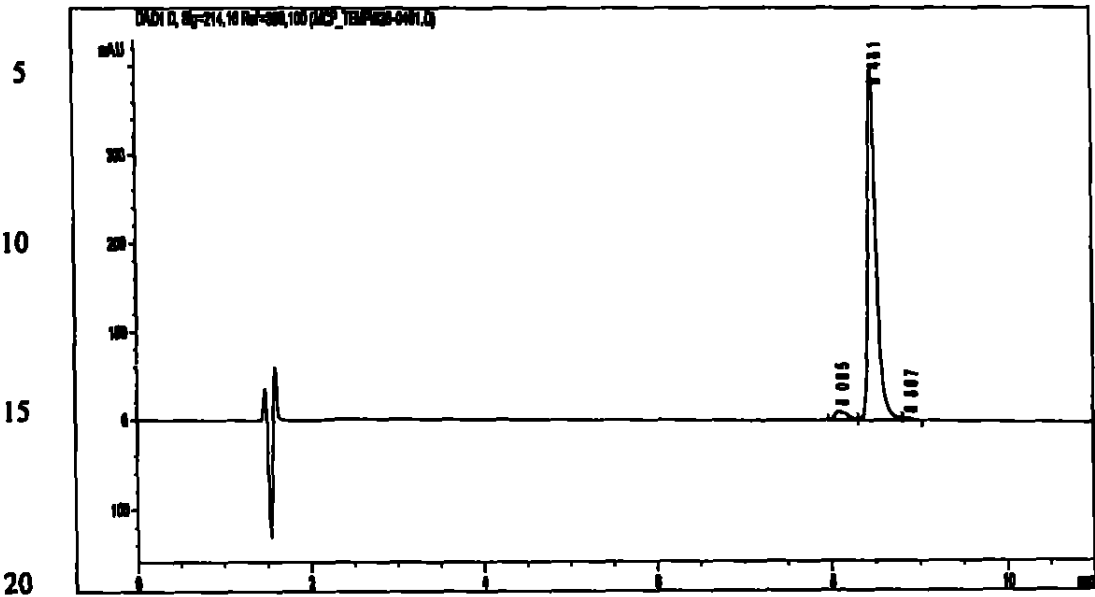
20 24 h



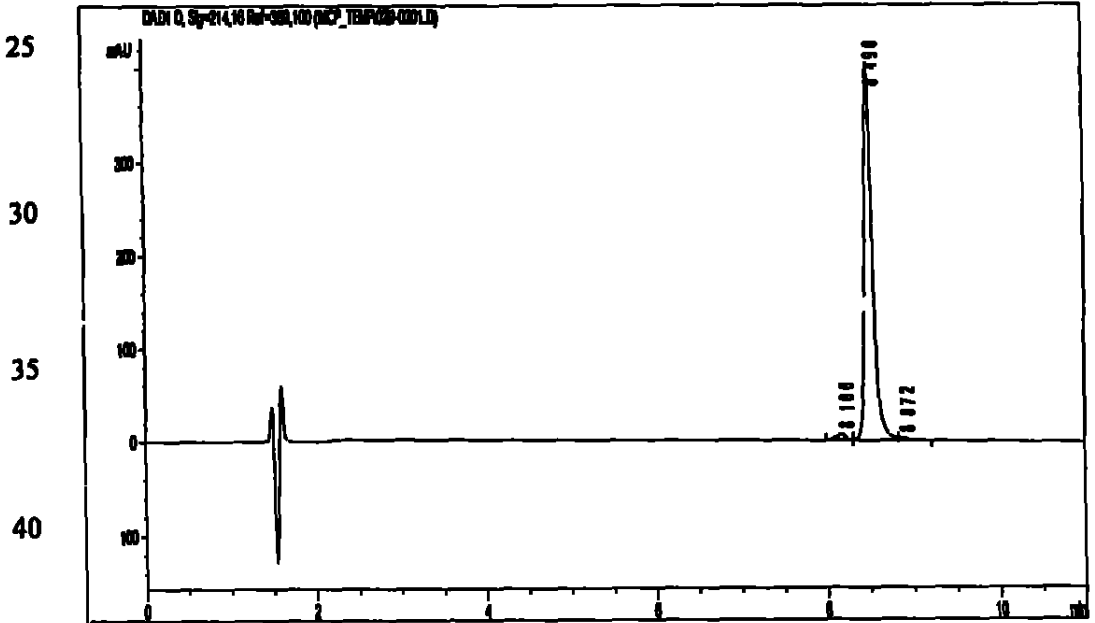
40

FIG 1

2/8
48 h



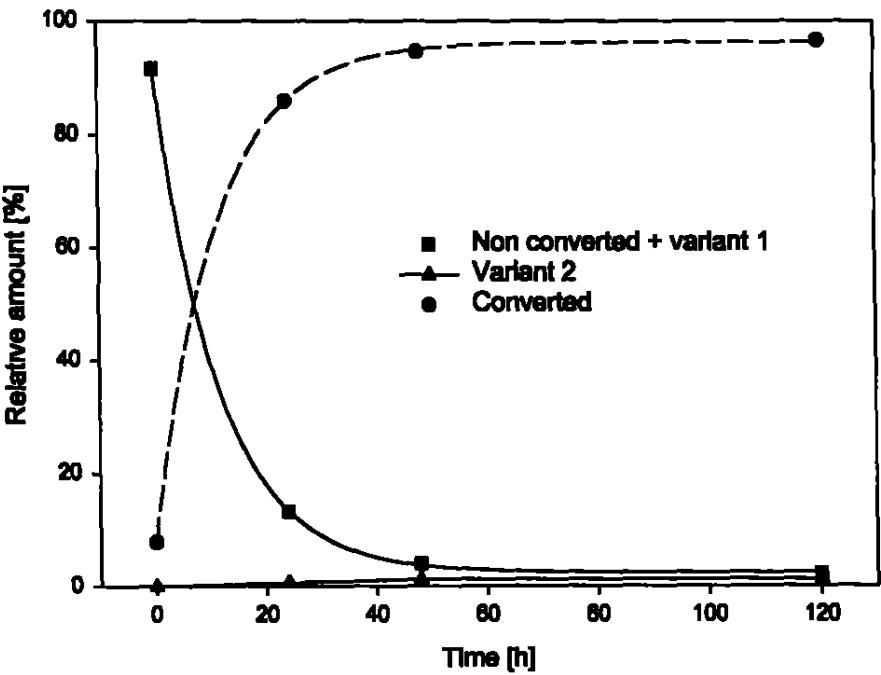
120 h



45

FIG. 1 (continued)

3/8



5

FIG. 2

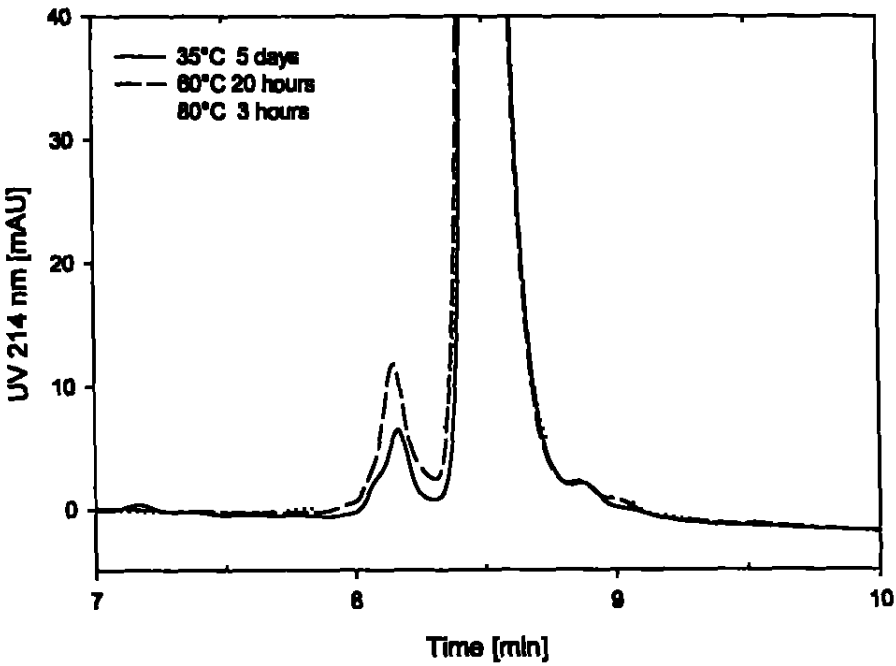


FIG 3

5/8

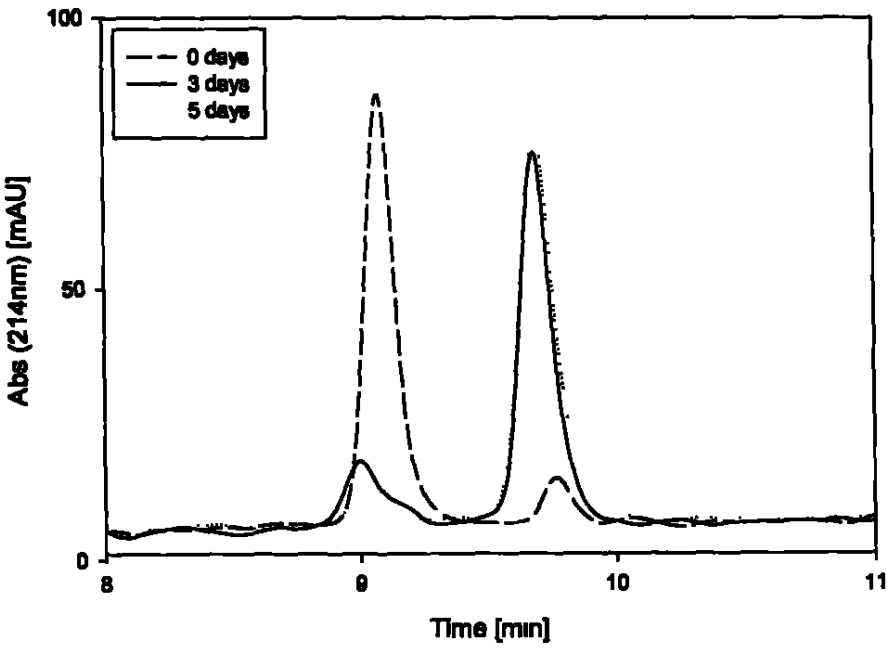


FIG 4

6/8

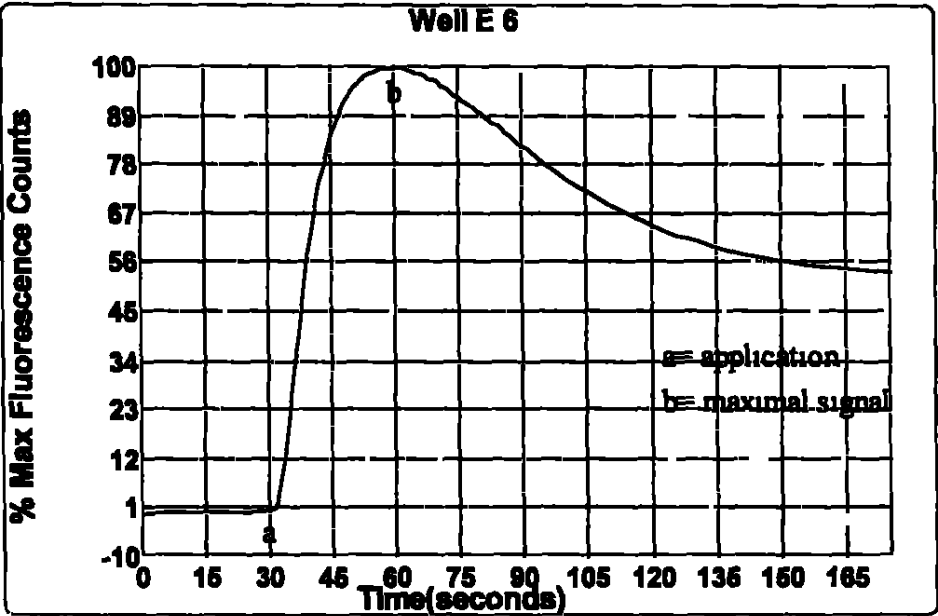
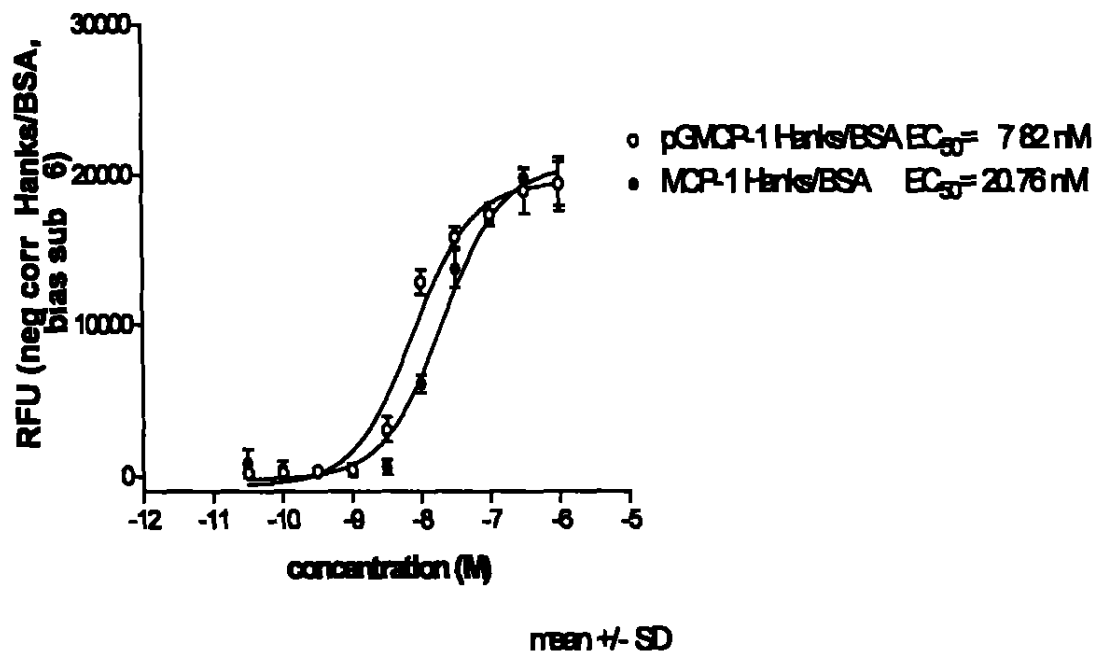


FIG 5

7/8

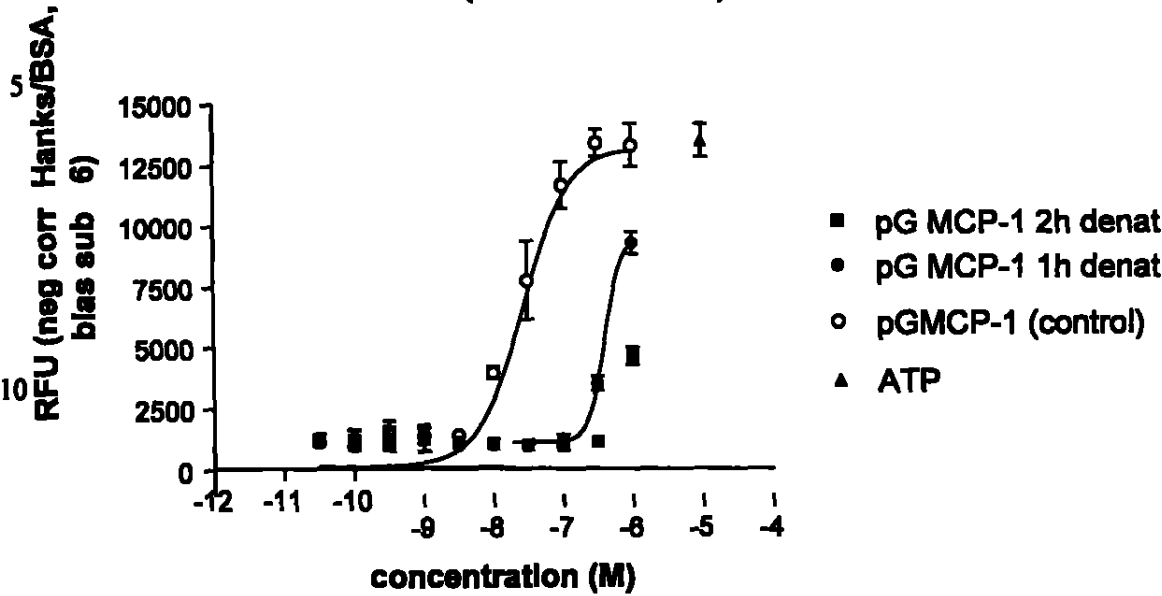
Comparison of pyroGlu
MCP-1 (Ch 071100kh) with
MCP-1 (Peprotech)



5

FIG. 6

Comparison of denatured pyroGlu
MCP-1 (95°C for 1 or 2 h)



15

mean +/- SD

FIG 7

20

Procedimiento para la preparación de un factor quimiotáctico modificado en el N-terminal

El invento se refiere a un procedimiento para la preparación de piroGlu-MCP-1 a partir de Gln-MCP-1 preparado por vía recombinante, así como a composiciones que contienen preparados de piroGlu-MCP-1

MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1 (proteína-1 quimioattractiva de monocitos), conocida también bajo las denominaciones "MCAF" factor quimiotáctico y activante de monocitos, "MCF" factor quimiotáctico de macrófagos, "TSG-8", "HC-11" factor de necrosis tumoral estimulado por genes-8, "SMC-CF" factor quimiotáctico de células de músculo liso, "LDCF" factor quimiotáctico derivado de linfocitos, así como "GDCF" factor quimiotáctico derivado del glioma) es un miembro de la familia de las quimioquinas CC. La proteína MCP-1 del ser humano fue descrita en un principio en la patente de EE UU n° 5 714 578. Bajo condiciones normales se sintetiza (nativa) en el organismo como proteína precursora con una longitud de 99 aminoácidos, la cual es procesada a continuación a un péptido con 76 radicales aminoácido. La MCP-1 humana madura (hMCP-1) es una glicoproteína con un peso molecular de 14 kDa y es secretada por numerosos tipos de células, por ejemplo por células del músculo liso y células endoteliales (Leonard y Yoshimura (1990), Immology Today 11,97-101). Contiene dos puentes disulfuro intramoleculares y, en el caso de expresión nativa, está O-glicosilada y sialilizada (J Yan Ling et al (1990), Journal of Biological Chemistry, 265, 18318-18321).

La proteína es un producto del gen JE de la localización cromosomal 17q11.2-q21.1. Esta localización génica se conoce también como SCY A2 ("small inducible cytokine A2, citoquina A2 poco inducible). El gen humano fue descrito por primera vez en la patente de EE UU n° 5 212 073. La expresión de este gen puede ser inducida por muchos tipos de citoquinas, así, por ejemplo, por el factor alfa de necrosis tumoral y también, por ejemplo, por la inmunoglobulina G. La secuencia del gen y más

informaciones acerca del gen y del producto génico se pueden obtener en el banco de datos NCBI bajo el número de acceso M37719 (véase Tabla 1)

Tabla 1

Códigos completos de los genes de la proteína quimiotáctica de monocitos humanos	
LOCALIZACIÓN	HUMMCHEMP 2776 bp ADN lineal PRI 13-MAY-1994
DEFINICIÓN	Códigos completos de los genes de la proteína quimiotáctica de monocitos humanos
ACCESO	M37719
5 VERSIÓN	M37719 1 GI 187447
CLAVES	proteína quimiotáctica de monocitos
FUENTE	Homo sapiens (ser humano)
ORGANISMO	Homo sapiens
10	Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata Euteleostomi, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini Hominidae, Homo
REFERENCIA	1 (bases 1 a 2776)
AUTORES	Shyy, Y J, Li, Y S y Kolattukudy, P E
15 TÍTULO	Estructura de la proteína quimiotáctica de los genes de monocitos humanos y su regulación por ATP
REVISTA	Biochem Biophys Res Commun 169 (2), 346-351 (1990)
MEDLINE	90290466
COMENTARIO	Fuente original ADN humano
RASGOS	Localización/Calificación
20 fuente	1 2776 /organismo="Homo sapiens" /db_xref="taxon 9606"
gen	598 2080 /gen="SCYA2"
25 CDS	unión(598 673,1472 1589,1975 2080) /gen="SCYA2" /nota="proteína quimiotáctica de monocitos" / inicio codón=1 /proteína_id="AAA18102 1" /db_xref="GI 487124"
30 traducción=	"MKVSAALLCLLLIAATFIPOGLAQPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLA SYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEICADPKQKQWQDSMDHLDKQTQTPKT"
exón	<598 673 /gen="SCYA2"
35	/nota="proteína quimiotáctica de monocitos" /número=1
exón	598 673 /gen="SCYA2"
40	/nota="proteína quimiotáctica de monocitos" /número=1
intrón	674 1471 /gen="SCYA2"
exón	/nota="proteína quimiotáctica intrón A de monocitos" 1472 1589 /gen="SCYA2"
45	/nota="proteína quimiotáctica de monocitos" /número=2
intrón	1590 1974 /gen="SCYA2"
50	/nota="proteína quimiotáctica intrón B de monocitos" 1975 2080 /gen="SCYA2"
exón	/nota="proteína quimiotáctica de monocitos" /número=3
55	1975 >2080 /gen="SCYA2"
exón	/nota="proteína quimiotáctica de monocito" /número=3

4

	BASE CONT	700 a	727 c	565 g	781 t	3 otros
	ORIGINAL					
1	cagttcaatg	tttacacaat	cctacagttc	tgctaggett	ctatgatgct	actattctgc
61	atttgaatga	gcaaatggat	ttaatgcatt	gtcagggagc	cggccaaagc	ttgagagctc
5	121	cttcctggct	gggaggcccc	ttggaatgtg	gcctgaagg	aagctggcag
181	atgctttcat	ctagtttctt	cgcttccttc	cttttcctgc	agttttcgct	tcagagaaag
241	cagaatcctt	aaaaataacc	ctcttagttc	acatctgtgg	tcagtctggg	cttaatggca
301	ccccatcctc	cccatttgcg	tcatttggte	tcagcagtga	atggaaaaaa	gtgctcgtcc
361	tcacccccct	gcttcctttt	cctacttcct	ggaaatccac	aggatgctgc	atttgctcag
10	421	cagatttaac	agcccactta	tcactcatgg	aagatccctc	ctcctgcttg
481	ctctccctct	gcccgccttc	aataagaggc	agagacagca	gccagaggaa	ccgagaggct
541	gagactaacc	cagaaacatc	caattctcaa	actgaagctc	gcactctcgc	ctccagcagt
601	aaagtctctg	ccgcccttct	gtgcctgctg	ctcatagcag	ccaccttcat	tccccaaggg
661	ctcgctcagc	caggtaaggc	cccctcttct	tctccttgaa	ccacattgtc	ttctctctga
15	721	gttatcatgg	accatccaag	cagacgtgg	accacagtc	ttgctttaac
781	caagataagg	tgactcagaa	aaggacaagg	ggtgagcccc	aaccacacag	ctgctgctcg
841	gcagagcctg	aactagaatt	ccagctgtga	acccaatcc	agctccttcc	aggattcagg
901	atccagctct	gggaacacac	tcagcagtta	ctccccagc	tgcttcagc	agagtttggg
961	gatcagggta	atcaaagaga	aggggtgggtg	tgtaggctgt	ttccagacac	gctggagacc
20	1021	cagaatctgg	tctgtgcttc	attcacctta	gcttcagag	accggtgact
1081	tgagtatcag	ggaaactcat	gaccaggcat	agctattcag	agtctaaaag	gaggctcata
1141	gtggggctcc	cagctgatct	tccctgggtc	tgatcatctg	gattattgg	ccgtcttaat
1201	gacacttgta	ggcattatct	agctttaaca	gtcctcctt	ctctctgtcc	attatcaatg
1261	ttatataccc	cattttacag	cataggaaac	tgagtcattg	ggtcaaagat	cacattctag
25	1321	ctctgaggta	taggcagaag	cactgggatt	taatgagctc	tttctcttct
1381	ttttgttttt	tctcatgac	tcttttctgc	tcttaagatc	agaataatcc	agttcatcct
1441	aaaatgcttt	tctttgtggt	ttattttcca	gatgcaatca	atgcccagat	cacctgctgc
1501	tataacttca	ccaataggaa	gatctcagtg	cagaggctcg	cgagctatag	aagaatcacc
1561	agcagcaagt	gtcccaaaga	agctgtgatg	tgagttcagc	acaccaacct	tccctggcct
30	1621	gaagtctctc	cttgtggagc	aagggaacaag	cctcataaac	ctagagtcag
1681	atttaactta	atgtacaaag	gttcccaatg	ggaaaactga	ggcaccaagg	gaaaaagtga
1741	accccaacat	cactctccac	ctgggtgcct	attcagaaca	ccccaatttc	tttagcttga
1801	agtcaggatg	gctccacctg	gacacctata	ggagcagttt	gccctgggtt	ccctccttcc
1861	acctgcgtcc	tcctagtctc	catggcagct	cgcttttgg	gcagaatggg	ctgcacttct
35	1921	agaccanaac	tgcaagggaa	cttcatctaa	ctctgtctcc	tcccttcccc
1981	gaccattgtg	gccaaggaga	tctgtgctga	ccccaaagcag	aagtggttcc	aggattccat
2041	ggaccacctg	gacaagcaaa	cccaactcc	gaagacttga	acactcactc	cacaacccaa
2101	gaatctgcag	ctaacttatt	ttcccctagc	tttccccaga	cacctgtttt	tattttatta
2161	taatgaattt	tgtttgttga	tgtgaacat	tatgccttaa	gtaatgttaa	ttcttattta
40	2221	agttattgat	gttttaagtt	tatctttcat	ggtactagt	ttttttagat
2281	ggggaaattg	cttttctctt	tgaaccacag	ttctaccct	gggatgtttt	gaggttcttt
2341	gcaagaatca	ttaatacaaa	gaattttttt	taacattcca	atgcattgct	aaaatattat
2401	tgtggaaatg	aatattttgt	aactattaca	ccaaataaat	atatttttgt	acaaaacctg
2461	acttccagt	ttttcttgaa	ggaaattaca	aagctgagag	tatgagcttg	gtggtgacaa
45	2521	aggaacatga	tttcagaggg	tggggcttac	attttgaagg	aatgggaaag
2581	cnntntcttc	ctccactggg	tgggtctctc	tgagtctccg	gtagaagaat	ctttatggca
2641	ggccagttag	gcattaaagc	accacccttc	cagtcttcaa	cataagcagc	ccagagtcca
2701	atgaccctgg	tcaccctatt	gcaagagccc	acccctattt	cttttgctct	cacgacctg
2761	accctgcatg	caattt				
50	//					

Ya en el documento de EE UU 5 714 578, antes mencionado,
 55 se describió que en el caso de una proteína MCP-1 aislada a
 partir de una fuente nativa el N-terminal está bloqueado Tal
 como se descubrió posteriormente, esto se puede atribuir a una

modificación postranslacional, en la cual la glutamina liberada tras la separación de la secuencia líder en el N-terminal de la proteína madura se cicla a un radical piroglutamato bajo la liberación de una molécula de NH_3

- 5 La identificación en el documento de EE UU 5 212 073 de los tramos de lectura abierta codificantes de MCP-1 hizo posible la expresión recombinante de la proteína. Una MCP-1 preparada por vía recombinante, por ejemplo en *E. coli* no muestra la típica estructura de N- o respectivamente O-glicosilización de la MCP-1 nativa. Un preparado de MCP-1 obtenido por esta vía
10 tampoco se resiste a la degradación de Edmann al contrario de una preparado obtenido a partir de material nativo, por lo tanto contiene N-terminales (glutamina) no bloqueados. En ensayos celulares, los cuales se basan en el efecto quimiotáctico sobre macrófagos, no se pudo constatar ninguna diferencia entre la
15 actividad biológica de preparados de MCP-1 nativos y los obtenidos por vía recombinante.

- Bajo condiciones fisiológicas la MCP-1 actúa como agonista en los receptores CCR2 y CCR4 de beta quimioquina, los cuales se
20 expresan principalmente sobre monocitos y que, además, se encontraron también sobre basófilos, así como sobre linfocitos T y B. La MCP-1 induce la quimiotaxis de monocitos ya en concentraciones subnanomolares. Los receptores CCR2 y CCR4 son receptores de siete-dominios-transmembrana acoplados a la
25 proteína G, los cuales conducen a la activación de monocitos y a la adhesión reforzada de integrinas. De este proceso resulta finalmente un adosamiento de monocitos a células endoteliales y subsiguiente salida de los monocitos del sistema linfático.

- En el documento WO 98/44953 se da a conocer una influencia
30 de la MCP-1 sobre la génesis arterial, es decir el crecimiento de arterias colaterales y/u otras arterias partiendo de uniones arteriolas ya existentes. En base a este descubrimiento, en la solicitud de patente internacional mencionada se propuso emplear MCP-1 para fines terapéuticos, a saber para el tratamiento de
35 enfermedades vasculares oclusivas, las cuales se pueden paliar estimulando la nueva formación de vasos. Estas enfermedades

vasculares oclusivas son especialmente enfermedades de las arterias coronarias (coronary artery disease, CAD), enfermedades oclusivas de arterias periféricas (peripheral arterial occlusive disease, PAOD), enfermedades oclusivas de arterias cerebrales y mesenteriales, etc. En este documento se propuso, además, emplear agentes neutralizantes de MCP-1, tales como por ejemplo anticuerpos anti-MCP-1 para impedir la nueva formación de vasos y, con ello, combatir especialmente el crecimiento de tumores, el cual depende de un suficiente suministro de sangre y, con ello, de una suficiente vascularización del tejido tumoral

Para poder utilizar la proteína MCP-1, como se menciona anteriormente, en una aplicación terapéutica para fomentar la vascularización de tejidos se tienen que poner a disposición suficientes cantidades de esta proteína en pureza suficientemente elevada para fines farmacéuticos. La MCP-1 humana se obtuvo en un principio en forma nativa a partir de cultivos de la línea celular del glioma humano U105MG o a partir de leucocitos mononucleares humanos de la sangre periférica. Un aislamiento de la proteína pensada para fines terapéuticos a partir de estas fuentes tropieza ya en que de esta manera habría que obtener cantidades suficientemente grandes, en todo caso, bajo un elevado coste y/o de una cantidad de material, inaceptables. Leucocitos humanos no se podrían obtener en la cantidad necesaria. Ciertamente, las células del glioma se podrían multiplicar casi de forma ilimitada, pero no son adecuadas para el cultivo en fermentadoras biotecnológicas y requieren, además, por ejemplo, de suero de ternera fetal para su cultivo, con todos los problemas relacionados con ello.

En lugar de la expresión nativa de MCP-1, se ofrece preparar MCP-1 por vía recombinante. De hecho, MCP-1 humana recombinante se puede obtener ya en el comercio, así especialmente de las razones sociales R&D Systems (nº de catálogo 279-MC) y Peprotech (Nº de catálogo 300-04, véase Tabla 2, los citados números de catálogo se refieren al estado de enero de 2003). Conforme a las especificaciones del producto de los preparados de MCP-1 recombinante que se pueden obtener

comercialmente, la proteína MCP-1 allí contenida contiene el aminoácido glutamina (Q) en el N-terminal. La descripción del producto indica, además, que este preparado de proteína es muy sensible especialmente en estado líquido reconstituido
5 (almacenamiento a 4°C recomendado para un máximo de 1 semana). De hecho, en ensayos realizados por los inventores (estado interno de la técnica) se comprobó que en el caso de un almacenamiento en estado líquido de los preparados de proteína MCP-1 convencionales, el preparado proteico - biológicamente
10 activo - parecía mostrar muy pronto, especialmente a temperaturas superiores a 4°C, señales de impurezas por productos de degradación (aparición de bandas secundarias los cromatogramas HPLC analíticos).

Tabla 2 (extracto de la página web de Internet de la razón social Preprotech

<http://www.preprotech.com/content/details.htm?result=1&prod=1392>.

5 MCAF Recombinante Humana (MCP-1 Humana)

Descripción	La proteína -1 quimiotáctica (MCP-1) de monocitos humanos, también conocida como factor activante y quimiotáctico (MCAF) de macrófagos/monocitos humanos es una proteína con 8,6 kDa que contiene 76 radicales aminoácido. Juega un importante papel en la respuesta inflamatoria de los monocitos de la sangre y macrófagos tisulares.
Catálogo #	300-04
Fuente	E. coli
Formulación	La solución filtrada de modo estéril fue liofilizada sin aditivos.
Estabilidad	La proteína liofilizada es estéril durante pocas semanas a la temperatura ambiente, pero se almacena mejor a -20°C. Una vez reconstituida, MCAF humana se puede almacenar en lotes de trabajo a -20°C.
Pureza	Superior al 99% por SDS-PAGE y análisis HPLC. El nivel de endotoxina es menor que 0,1 ng por µg (1 EU/µg).
Reconstitución	Recomendamos un rápido centrifugado seguido de su reconstitución en agua a una concentración de 0,1-1,0 mg/ml. Esta solución se puede diluir en otros tampones acuosos y almacenar a 4°C durante 1 semana o a -20°C para un futuro uso.
Actividad biológica	Determinada por su capacidad quimioattractiva de monocitos humanos usada en una concentración del orden de 5,0-20,0 ng/ml.
Secuencia AA	QPDAINAPVT CCYNFTNRKI SVQRLASYRR ITSSKCPKEA VIFKTIVAKE ICADPKQKWV QDSMDHLDKQ TQTPKT
País de origen	EE UU

10 Un procedimiento clásico para la preparación recombinante de proteína MCP-1 humana consiste en la expresión inducida por la temperatura de la proteína en forma de proteína de fusión, la purificación de los cuerpos de inclusión formados a continuación, la disolución y repliegue de la proteína y la

subsiguiente liberación enzimática de la proteína hMCP-1 a partir de la proteína de fusión

En el caso de procedimientos convencionales para la preparación recombinante de proteína MCP-1 humana se presenta el problema de que como producto secundario se obtiene frecuentemente una proteína acortada en posición N-terminal en uno o varios aminoácidos. Estos productos secundarios se pueden comportar en los sistemas biológicos como antagonistas en receptores de MCP-1

En Van Coillie et al (1998), Biochemistry 37 12672, 12673 a E se describe un procedimiento en relación con ensayos acerca de la influencia de modificaciones N-terminales sobre la actividad biológica de MCP-2, en el cual un preparado de MCP-2 obtenido por vía recombinante se incubaba en Na_2HPO_4 0,01 M, pH 8,0, durante 24 horas a 37°C. A nivel de la secuencia de aminoácidos MCP-2 muestra un grado de homología del 62% con respecto a MCP-1 y también se distingue de éste en tanto que MCP-1 no modificado en el N-terminal es biológicamente activo en contraposición con el MCP-2 (véase la fila "actividad biológica" en Tabla 2). Bajo las condiciones anteriormente citadas, los autores no determinaron la medida de la conversión del radical glutamina N-terminal para dar un radical piroglutamato. Sin embargo, según reconocen los autores (estado interno de la técnica) una aplicación de condiciones comparables sobre MCP-1 conduce sólo a una ciclación parcial del aminoácido N-terminal (véase Tabla 3, ensayo comparativo 2).

Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones, una misión del invento es por consiguiente poner a disposición un procedimiento con cuya ayuda se pueda obtener un preparado de MCP-1 (composición de MCP-1), que (a) en lo referente a su actividad biológica sea adecuado para fines terapéuticos y (b) ofrezca ventajas en cuanto al proceso de autorización legal del medicamento, la cual en el caso de agentes biofarmacéuticos comprende exigencias particularmente difíciles de cumplir, por ejemplo en lo referente a la pureza y capacidad de reproducción de la obtención del medicamento, y (c) que presente una elevada

estabilidad de almacenamiento Otra misión relacionada con ello es la puesta a disposición de composiciones o, respectivamente, preparados que contengan MCP-1 obtenido por vía recombinante y que sean adecuadas para los fines antes citados y, respectivamente, ofrezcan las ventajas antes citadas

Estos problemas se soluciona por los procedimientos y las composiciones que contienen MCP-1 indicados en las reivindicaciones

Así, conforme al invento se pone a disposición un procedimiento para la preparación de piroGlu-MCP-1 a partir de Gln-MCP-1 obtenido por vía recombinante, en el cual se incuba Gln-MCP-1 a una temperatura en el intervalo de 30°C y 80°C, preferentemente en el intervalo de 30°C y 70°C, y más preferentemente en el intervalo de 35°C a 60°C, en una solución tampón que presenta una concentración salina en el intervalo de 10 mM a 160 mM, preferentemente en el intervalo de 10 mM a 100 mM, y que presenta un valor del pH en el intervalo de 2 a 7,5, preferentemente 3,5 a 7,5, más preferentemente 3,5 a 6,5, más preferentemente 5 a 6,5, más preferentemente 5,5 a 6,5 y más preferentemente un valor del pH alrededor de 6 En este caso, la incubación se lleva a cabo hasta que al menos el 90%, preferentemente al menos el 95% y más preferentemente al menos el 96% de la MCP-1 contenida en la solución tampón se encuentre en forma de piroGlu-MCP-1

Por "MCP-1" en el marco de esta divulgación se entiende la proteína MCP-1 (sin prosecuencia previa), según cada contexto con un radical glutamina N-terminal ("Gln-MCP-1", confróntese la secuencia de aminoácidos mostrada en Tabla 1 y Tabla 2) o ya con el N-terminal convertido/ciclado a radical piroglutamato ("piroGlu-MCP-1") Sin embargo, es obvio que las modificaciones de la proteína MCP-1 que no repercuten en su función biológica (especialmente el efecto de atracción de monocitos o el efecto sobre el receptor de CCR) y que no varían su estructura de tal modo que los parámetros de reacción anteriormente descritos no conduzcan ya al resultado deseado (es decir, que la proteína ya no se pueda transformar según el procedimiento conforme al

invento en una piroGlu-variante) no quedan fuera del ámbito de protección. Así, el procedimiento conforme al invento se puede aplicar naturalmente también a una MCP-1 en la cual haya tenido lugar un intercambio conservativo de aminoácidos, por ejemplo
5 serina por treonina o leucina por isoleucina, siempre que éste no repercuta ni sobre la función o actividad biológica de la proteína resultante, ni sobre la capacidad de conversión de la glutamina N-terminal en piroglutamato conforme al procedimiento anterior. El procedimiento conforme al invento se puede aplicar
10 también a proteínas MCP-1 de otros mamíferos tales como, por ejemplo, rata, ratón, cobaya, conejo y hurón (y algunos más).

La solución tampón en la cual se realiza el procedimiento anteriormente descrito es preferentemente una solución acuosa tamponada con fosfato (tamponada con fosfato de sodio y/o de
15 potasio) de molaridad baja o fisiológica, a saber en el intervalo de 10 a 160 mM, 10 a 80 mM, 10 a 50 mM, 20 a 40 mM o alrededor de 20 o 40 mM.

Si se aceptan tiempos de incubación más largos, entonces, de modo correspondiente a una forma de realización especial del
20 invento, se puede trabajar también con molaridades fisiológicas tales como, por ejemplo, alrededor de 150 mM de concentración salina, consiguiéndose preferentemente esta molaridad utilizando una solución salina tamponada con fosfato o "PBS". El inconveniente de un tiempo de incubación más largo - y con ello el
25 riesgo de una proporción creciente de productos de degradación, productos secundarios o de oxidación - se compensa en esta forma especial de realización por la ventaja de poder obtener el preparado protéico inmediatamente en forma de una solución con concentración salina fisiológica.

30 Además de esto, la solución tampón en la cual se realiza la etapa de modificación puede contener también, por ejemplo, un detergente (suave), un agente antioxidante, un conservante, un formador de complejos, estabilizantes, reactivos antimicrobianos, etc.

35 La temperatura de incubación se elige en el intervalo de 30°C a 80°C, es decir por encima de la temperatura ambiente. En

el caso de temperaturas más bajas, la etapa de conversión transcurre sólo lentamente. Para alcanzar, a pesar de ello, una conversión prácticamente completa habría que prolongar entonces considerablemente la duración de la incubación hasta más de una semana. Esto conduciría a tiempos de vida inaceptables en el transcurso biotecnológico del procedimiento y aumentaría, además, considerablemente el peligro de diferentes impurezas en la solución protéica (por productos de degradación u oxidación, bacterias, virus u otros gérmenes). Por otra parte, un aumento de la temperatura de incubación por encima de 80°C conduce ciertamente a una fuerte aceleración de la reacción de conversión, pero también en este caso a una mayor formación de productos secundarios y de degradación, no deseados (compárense Ejemplos 1 y 2). Si son aceptables tiempos de vida de hasta 6 días, entonces se prefiere particularmente una temperatura de incubación de 35 a 40°C. Por el contrario, en los casos en los que a ser posible se tenga que incubar de forma claramente más breve, se puede incubar también en el intervalo de 50 a 60, 70 o 80°C. Naturalmente, temperaturas comprendidas entre 40 y 50°C conducen también al resultado deseado.

El valor del pH de la solución tampón de incubación se debería situar en el intervalo de 2 a 7,5, es decir en zona neutra a ácida. Se encuentra preferentemente en el intervalo de 3,5 a 7,5, de modo más preferente en el intervalo de 3,5 a 6,5, más preferentemente en el intervalo de 5 a 6,5, más preferentemente en el intervalo de 5,5 a 6,5 y más preferentemente se elige un valor del pH alrededor de 6.

En caso de la adecuada elección de los parámetros descritos, por ejemplo, con más detalle en los ejemplos, la variante piroGlu-MCP-1 se puede obtener con un grado de pureza de, en cada caso, 90%, pero también superior, por ejemplo 95%, 96% o 98%, indicando este dato porcentual la cantidad de piroGlu-MCP-1 (determinada por ejemplo como superficie bajo la curva en un perfil de elución HPLC) referida a la cantidad de MCP-1 total existente en la solución (es decir, inclusive una eventual proporción de Gln-MCP-1 remanente y posibles productos

de oxidación y otros productos secundarios o de degradación)

Conforme a otra forma de realización del invento se pone a disposición un procedimiento para la obtención de un preparado de piroGlu-MCP-1, el cual comprende al menos las siguientes etapas

- obtención de un preparado de Gln-MCP-1 por vía recombinante por expresión en una célula huésped de una construcción génica codificante de MCP-1,
- concentración y/o purificación opcional de la Gln-MCP-1 que está contenida en el preparado de Gln-MCP-1, y finalmente
- conversión de la Gln-MCP-1 que está contenida en el preparado de Gln-MCP-1 o, respectivamente, que estaba contenida antes de la concentración y/o purificación, en un preparado de piroGlu-MCP-1, el cual contiene la especie de moléculas protéicas de piroGlu-MCP-1, realizándose esta etapa conforme al "procedimiento para la preparación de piroGlu-MCP-1 a partir de Gln-MCP-1 preparado de modo recombinante"

Opcionalmente, este procedimiento puede comprender, además, por ejemplo la trans-tamponación del preparado de piroGlu-MCP-1 o la purificación ulterior, por ejemplo a través de una subsiguiente etapa de cromatografía en columna, una diálisis, una ultracentrifugación, etc

Los procedimientos para la preparación biotecnológica de proteínas recombinantes son conocidos. Abarcan especialmente etapas de fermentación, purificación, concentración y otras etapas. La etapa de conversión anteriormente mencionado se puede insertar en diferentes posiciones dentro de un "procedimiento de múltiples etapas" de este tipo, es decir, por ejemplo con una solución protéica de MCP-1 aún ampliamente sin purificar o también ya totalmente purificada, como solución de partida. Especialmente, cabe pensar también en un transcurso del procedimiento, en el cual, entre medias, Gln-MCP-1 no convertido (totalmente), en forma más o menos purificada o prácticamente totalmente purificada se liofiliza en forma aún no convertida con el fin de mejorar la capacidad de almacenamiento y en el momento dado se pone nuevamente en solución y se convierte

después conforme al procedimiento anterior en piroGlu-MCP-1. Naturalmente, la solución protéica también se puede liofilizar después de la conversión en piroGlu-MCP-1.

El producto del procedimiento, a saber el preparado de piroGlu-MCP-1 sometido a la modificación N-terminal, contiene conforme al invento, referido al contenido total en MCP-1 (proteína convertida más la no convertida más, por ejemplo, los productos secundarios originados por oxidación), una proporción de piroGlu-MCP-1 de al menos 90%, preferentemente al menos 95% y de modo más preferido al menos 96%.

Con la referencia "preparado de (Gln- o, respectivamente, piroGlu-MCP-1, se quiere expresar que en las diferentes etapas del procedimiento la proteína MCP-1 se presenta en forma disuelta en una solución (tampón) y, por consiguiente, junto a la MCP-1 puede haber aún presentes otros componentes, tales como, en todo caso, los iones de la sal del tampón utilizado y con ello, eventualmente, otras sales, antioxidantes, estabilizantes, reactivos antimicrobianos, detergentes, conservantes, formadores de complejos, etc.

Conforme a un aspecto más del invento se pone a disposición una composición que contiene piroGlu-MCP-1 o un preparado de piroGlu-MCP-1, la cual se preparó según el procedimiento anteriormente citado, en la que al menos el 90% de la MCP-1 contenida en la composición (proteína convertida más proteína sin convertir más productos secundarios, es decir "la superficie bajo la curva", por ejemplo en un cromatograma de elución HPLC) se presenta en forma de piroGlu-MCP-1.

Por consiguiente, objeto del invento es, además, un preparado de MCP-1 obtenido por vía recombinante, especialmente en procariontes y, de modo particularmente preferido, en *E. coli*, en el cual al menos el 90% de la proteína MCP-1 se presenta en forma de piroGlu-MCP-1. En el caso de la preparación en células de expresión convencionales, la proteína - por el contrario que en la producción nativa - no muestra frecuentemente la estructura glicosilada natural. Especialmente en el caso de la preparación en procariontes tales como, por ejemplo

E coli, la piroGlu-MCP-1 obtenida o, respectivamente, el preparado de piroGlu-MCP-1 obtenido, en contra de la forma en que se presenta en el caso de la expresión nativa en el organismo humano, no está glicosilada y/o sialilizada, diferenciándose así de una proteína nativa de este tipo o, respectivamente, de un preparado protéico obtenido a partir de una fuente nativa

Una composición conforme al invento de este tipo puede ser especialmente un medicamento o una composición farmacéutica, que
10 junto a una proporción que supone ser al menos del 90%, 95% o 96% de piroGlu-MCP-1 en el contenido total de MCP-1 (proteína convertida más proteína no convertida más productos secundarios) contiene además coadyuvantes y sustancias de soporte habituales, sales, antioxidantes, estabilizantes, reactivos antimicrobianos,
15 detergentes, conservantes, formadores de complejos, etc La composición conforme al invento se puede utilizar para el tratamiento de pacientes que padecen una enfermedad arterio-oclusiva tal como especialmente PAOD o CAD El tratamiento comprende la administración de una composición de este tipo en
20 una cantidad terapéuticamente eficaz, por la vía adecuada, por ejemplo por infusión intraarterial o en forma de un gel depositado periarterialmente, a partir del cual la proteína MCP-1 se libera a lo largo de un espacio de tiempo más prolongado

Por lo tanto, de manera sorprendente se encontró que - de
25 otro modo que el esperado - la incubación en solución acuosa y a elevada temperatura de un preparado de proteína MCP-1, obtenido por vía recombinante, no conduce a su degradación ni a su inactivación biológica, sino que a través de esta etapa del procedimiento, nada habitual desde el punto de vista biotecnológico y,
30 en sí, por lo regular no deseada - por elección adecuada de un gran número de parámetros - se puede obtener un preparado de piroGlu-MCP-1 sorprendentemente homogéneo, totalmente activo biológicamente, el cual, además de esto, mantiene por su parte su homogeneidad aún durante un largo almacenamiento, es decir
35 que es más estable que el preparado de Gln-MCP-1 (de partida)

Autoridades tales como la Food and Drugs Administration en

EE UU o la EMEA en Europa condicionan la concesión a un fármaco de una autorización mercantil conforme a la legislación del medicamento al cumplimiento de numerosas condiciones, finalmente protectoras del paciente, exigidas a los fabricantes de medicamentos. Así, cada fabricante tiene que presentar certificados que demuestren, por ejemplo, la pureza del producto farmacéutico, su estabilidad de almacenamiento y su capacidad de preparación de forma reproducible. Estos tres aspectos citados son sólo una pequeña selección pero juegan un papel central precisamente en el caso de la autorización de biofármacos, es decir medicamentos que contienen principios activos macromoleculares, consistentes en sustancias naturales o derivados de éstas (proteínas, ácidos nucleicos, proteoglicanos, polisacáridos, etc). Frecuentemente, las exigencias planteadas al biofármaco en el marco de esta autorización son muy difíciles de cumplir. Por ejemplo, los principios activos basados en una proteína, después de su producción que tuvo lugar en un organismo celular más o menos complejo, tiene que ser sometidos a una purificación intensa y complicada, de varias etapas, y en ella no deben ser modificados en su estructura de manera incontrolada - por ejemplo por oxidaciones u otras reacciones espontáneas - Además de esto, el producto final debería poseer una estabilidad de almacenamiento aceptable y no tener que disponer de redes de distribución complicadas y caras entre el fabricante y el médico o paciente o la clínica que lo emplea - una exigencia que, en el caso de proteínas, donde es importante mantener la correcta estructura secundaria (plegamiento), sólo se puede cumplir, por lo regular, con grandes esfuerzos.

En el caso de la proteína MCP-1, la calidad de los preparados obtenibles comercialmente es en muchos aspectos suficiente para, por ejemplo, ensayos in vitro. Sin embargo, tal como en el transcurso de sus trabajos los inventores han sacado a la luz, estos mismos preparados no son nada bien adecuados para preparar un fármaco apto para una autorización. Ya una breve permanencia en solución a la temperatura ambiente antes de su administración al paciente, como no se puede excluir del

todo, por ejemplo en consultorios médicos u hospitales, conduce según reconocen los inventores a la aparición de productos de "degradación", inicialmente considerados como impurezas, en los preparados de MCP-1. Una purificación reforzada de la Gln-MCP-1 prevista inicialmente como principio activo pudo establecer de nuevo, brevemente, un alto grado de pureza, pero de nuevo frente a un corto tiempo de almacenamiento en solución y a la temperatura ambiente, tampoco este preparado era estable. La gestión de un procedimiento de autorización conforme a la legalidad del medicamento en base de un preparado de principio activo tan inestable va unida a enormes dificultades o es simplemente imposible.

Sorprendentemente, estos problemas se pudieron superar conforme a la enseñanza del invento incorporando una etapa no habitual de procedimiento, a primera vista altamente contraproducente, a saber la incubación a elevada temperatura (la cual según consideraciones reciente fomentaba precisamente la no homogeneidad) en el propio procedimiento de preparación y purificación. Llevada a cabo bajo condiciones optimizadas y analizadas en detalle por los inventores, una incubación de este tipo puede provocar ciertamente una conversión casi cuantitativa del propio principio activo Gln-MCP-1 original en la forma piroGlu-MCP-1 considerada inicialmente como impureza. Esta última forma es entonces asombrosamente estable frente a influencias desnaturalizantes de la proteína, tales como la incubación a elevada temperatura o causas análogas. Por consiguiente, se pudo poner a disposición un preparado de MCP-1 que en virtud de su elevada pureza y homogeneidad, capacidad de producción extraordinariamente reproducible y estabilidad de almacenamiento, es adecuado para su utilización como principio activo medicamentoso, y el cual tiene gran posibilidad de cumplir en los correspondientes procesos de autorización las severas exigencias citadas y que, por consiguiente, hace posible nuevos procedimientos terapéuticos basados en la eficacia de la MCP-1.

Conforme a un aspecto parcial del invento un preparado de

piroGlu-MCP-1, obtenido según el procedimiento citado anteriormente y en las reivindicaciones, se utiliza

- para el tratamiento terapéutico de enfermedades vasculares oclusivas tales como especialmente de enfermedades de las
5 arterias coronarias (coronary artery disease, CAD), enfermedades oclusivas de arterias periféricas (peripheral arterial occlusive disease, PAOD), enfermedades oclusivas de arterias cerebrales y mesenteriales, o

- para la preparación de un medicamento para el tratamiento de
10 enfermedades vasculares oclusivas tales como especialmente de enfermedades de las arterias coronarias (coronary artery disease, CAD), enfermedades oclusivas de las arterias periféricas (peripheral arterial occlusive disease, PAOD), enfermedades oclusivas de arterias cerebrales y mesenteriales

15 El invento también hace posible llevar a cabo un procedimiento para el tratamiento de un paciente que padezca de las citadas enfermedades vasculares oclusivas, según el cual el preparado de piroGlu-MCP-1 producido por conversión o el medicamento obtenido utilizando un preparado de piroGlu-MCP-1 de este
20 tipo se administra, por ejemplo, por inyección o infusión

En lo referente a cada uno de los parámetros optimizados del procedimiento, hay que advertir, además, que al biotécnico le cuesta no poco superar el hecho de incubar un preparado
25 protéico durante un espacio de tiempo más prolongado, circunstancialmente de múltiples días, a elevadas temperaturas de, por ejemplo, también 60°C En lo referente al valor del pH neutro a ácido de la solución de incubación, divulgado anteriormente como óptimo, se enfrenta en realidad la lógica química la conversión de glutamina a piroglutamato cíclico es
30 una reacción de sustitución nucleófila, en la cual un par de electrones libre en el átomo de nitrógeno atacante del grupo C- α -amino del glutamato ataca el átomo de C del grupo C- γ -amida Un valor ácido del pH conduciría, en sí, a una protonización reforzada del grupo C- α -amino y repercutiría,
35 por consiguiente, negativamente sobre la velocidad de reacción Pero según reconocimientos de los inventores, esto no es

precisamente el caso. Una explicación imaginable - que se ha de interpretar de modo no limitativo - podría ser que la proteína MCS-1 plegada forma para el N-terminal un microentorno, en el cual a pesar del valor ácido del pH de la solución acuosa
5 circundante el grupo amino se presenta no protonizado y, por lo tanto, un par de electrones libre queda disponible para el ataque nucleófilo

Ejemplos

10

Ejemplo 1 obtención de un preparado de piroGlu-MCP-1 conforme al procedimiento conforme al invento

Fermentación

15

La fermentación se llevó a cabo con una cepa de *Escherichia coli* K12(W3110). La cepa fue transformada con un plásmido ColE1 (derivado pBR322), el cual contiene los siguientes elementos: la secuencia genómica de la hMCP-1 bajo el control de un promotor generalmente habitual (fosfatasa, pPhoA), un origen de replicación ColE1 y el gen resistente a la tetraciclina. Para la
20 fermentación se cultivó previamente la cepa de producción en un matraz agitador, en medio LB que contenía tetraciclina. La incubación tuvo lugar a 37°C hasta alcanzar un DO de 1. El cultivo previo se transfirió a la fermentadora y se siguió
25 cultivando bajo agitación y aporte de aire a 37°C. El medio contenía glucosa, diversas sales, elementos traza, extracto de levadura, aminoácidos y tetraciclina. El valor del pH se mantuvo en 6,8 con amoníaco. En cuanto se hubo consumido la glucosa previamente dispuesta, por aporte de glucosa se mantuvo cons-
30 tante el oxígeno disuelto (pO_2) en el valor nominal del 40%. Tan pronto como se había consumido el fosfato en el medio, la inducción del promotor de fosfatasa tuvo lugar automáticamente. Al cabo de 39 horas se cosechó la biomasa con una centrífuga tubular (CEPA) y se almacenó a -70°C.

35

Apertura de las células y etapas de purificación de la proteína

El gránulo de células congelado se volvió a suspender con un Ultraturrax en la cuádruple cantidad de tampón de lisis (Tris 200 mM, NaCl 55 mM, EDTA 5 mM, pH 7,5) La apertura de las células tuvo lugar por dos pasadas con un homogeneizador a 460 bar Fragmentos de la rotura celular se separaron con una centrífuga CEPA El material sobrenadante se filtró opcionalmente con filtros Polysen II (1,2 μ m) (Millipore) y se cargó después en una combinación de columnas constituida por una Q sefarosa FF y una SP sefarosa FF Las columnas se habían equilibrado con tampón de lisis

Finalizada la carga, la combinación de columnas se lavó con tampón de lisis y se desenganchó la columna de Q sefarosa La SP sefarosa se siguió lavando con tampón de lisis, a continuación con urea 5 M (en tampón de lisis) y nuevamente con tampón de lisis La elución del producto tuvo lugar en un gradiente lineal de NaCl

El material eluido se salinizó con sulfato de amonio hasta una concentración final de 1,3 mol/l y se centrifugó durante 15 min a 3200 g El material sobrenadante se cargó en una columna de fenil-sefarosa, que estaba equilibrada con sulfato de amonio 1,3 M (en tampón de lisis)

El material que había fluido a través de la fenil-sefarosa se aplicó sobre una columna RPC Source 30, equilibrada con tampón de lisis El lavado posterior se hizo con tampón de lisis, agua y tampón A (5% de EtOH, 0,1% de TFA) El producto se eluyó en un gradiente lineal de 20% de tampón B (95% de EtOH, 0,1% de TFA) sobre 70% de tampón B en 10 volúmenes de columna

Etapas de conversión

El material eluido se diluyó hasta 1/10 en diferentes tampones, por ejemplo tampón fosfato, 10-40 mM, pH 6,0-7,4 Conforme a una forma de realización preferida, como pH final de la solución de conversión se aspiró a un valor comprendido entre 6,0 y 6,5 La concentración de proteína se situaba entre 0,2 y 1,0 mg/ml

La solución se filtró en condiciones estériles y se incubó

bajo ligera agitación (60 rpm) a temperaturas de 35-80°C (en diferentes tandas) El transcurso de la reacción se observó por análisis HPLC

5 Etapas de purificación final

Tan pronto como se hubo alcanzado el final de la reacción, la solución de conversión se cargó en una columna SP sefarosa HP, equilibrada con tampón A (fosfato 40 mM, pH 6,0) La elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de NaCl La concentración de NaCl en el material eluido era aproximadamente de 350 mmol/L La concentración de proteína aproximadamente de 3 mg/mL El material eluido se diluyó con tampón A a una conductividad correspondiente a NaCl 250 mM A continuación se siguió diluyendo con fosfato 40 mM, pH 6,0, NaCl 250 mM hasta que la solución de proteína era de 1 mg/mL La solución en bruto así formada se filtró en condiciones estériles y se almacenó a 4°C o -70°C hasta la formulación

Analítica

El transcurso de la etapa de conversión antes descrita se observó por RP-HPLC Se tomaron cromatogramas de los perfiles de elución antes del inicio de la reacción de conversión (t_0) y en los instante $t=24$ h, $t=48$ h y $t=120$ h Tal como se deduce de los cuatro cromatogramas que se muestran en la Fig 1, a una temperatura de incubación de 35°C, al cabo de 48 h se habían convertido a piroGlu-MCP-1 aproximadamente el 90% de la proteína Análisis por HPLC indicaban la correcta formación de los dos puentes disulfuro

La Fig 2 muestra la cinética de la reacción de Gln-MCP-1 a piroGlu-MCP-1 bajo las condiciones descritas En ella se puede ver que al ir aumentando el tiempo de reacción aparece una impureza, denominada en la Fig 2 como "variante 2", que no se pudo caracterizar con más detalle

Transcursos de reacción parecidos se observaron al llevar a cabo la etapa de conversión en tampón acetato de sodio 0,1 M, pH 5,5 o en tampón citrato de sodio 0,1M, pH 3,5 (datos no

mostrados)

La reacción anteriormente descrita se repitió, a excepción de que en lugar de una temperatura de reacción de 35°C, se eligieron temperaturas de 24°C, 60°C y 80°C. Como se puede deducir con ayuda de los datos recogidos en la Tabla 3, en el caso de 24°C no se obtuvieron, en tiempo comparable, rendimientos satisfactorios de piroGlu-MCP-1. Por el contrario, a 60°C y 80°C se observaron velocidades de reacción significativamente más elevadas. La tasa de reacción a 80°C era aproximadamente 50 veces superior a la tasa a temperatura ambiente

Tabla 3

	Temperatura [°C]	Velocidad const [1/h]	Tiempo semivida [h]	de Dura- ción	Pureza [%]
Ensayo comparativo 1 fosfato 20 mM pH 6,0	24	0,031	22,4	7,5 d	n.d
fosfato 20 mM pH 6,0	35	0,089	7,8	2,6 d	96,6
fosfato 20 mM pH 6,0	60	0,660	1,1	8,8 h	95,0
fosfato 20 mM pH 6,0	80	1,670	0,4	3,2 h	91,3
fosfato 20 mM pH 6,0 NaCl 150 mM	35	0,041	16,9	5,6 d	n.d.
fosfato 20 mM pH 6,0 5% EtOH	35	0,108	6,4	2,1 d	95
Ensayo comparativo 2, fosfato 20 mM pH 8,5	35	0,037	18,7	6,2 d	n.d.
PBS Tween, 3,5% EtOH, 0,01% TFA pH 7,4	35	0,040	17,3	5,7 d	95

n.d = no determinado, tras la duración indicada no se había alcanzado el final de la reacción

No obstante, una temperatura de reacción más elevada favorece también la formación de productos secundarios o de degradación, lo cual reduce el grado de pureza - especialmente en el caso de llevar a cabo el ensayo a 80°C (Tabla 3)

En la Fig 3 se muestran a elevada disolución los cromatogramas del perfil de elución de preparados de piroGlu-MCP-1 que se obtuvieron bajo las condiciones recogidas en la Tabla 3 (tampón fosfato 20 mM, 35°C, 60°C y, respectivamente, 80°C). Como se deduce de ello, a elevadas temperatura, incluso

en el caso de incubación de corta duración (por ejemplo 3 horas a 80°C) aparecen claramente más impurezas junto con productos secundarios o de degradación de MPC-1 que en el caso de una incubación durante cinco días a 35°C

- 5 El contenido en (por ejemplo 5%) de etanol (EtOH) que condiciona técnicamente la producción en determinadas ejecuciones del procedimiento, por lo demás con condiciones de ensayo constantes (tampón fosfato 20 mM, pH 6,0) no repercutía negativamente sobre las tasas de reacción o sobre el grado de
10 pureza del producto

Ejemplo 2 obtención de un preparado de piroGlu-MCP-1 conforme a un procedimiento alternativo conforme al invento

- 15 La fermentación, la apertura de células y las etapas de purificación de la proteína se llevaron a cabo tal como se explica en el Ejemplo 1

Etapas de conversión

- 20 El material eluido de la cepa 30 RPC se diluyó 1:10 con BPS, 0,02% de Tween 20. La concentración de proteína estaba entonces comprendida entre 0,2 y 0,5 mg/mL, el pH era aproximadamente 7,4. Además de los componentes del tampón, la solución contenía aproximadamente 3,5% de EtOH y 0,01% de TFA, que
25 procedían del material eluido de la etapa anterior con la cepa 30 RPC. La solución se filtró en condiciones estériles con un Millipak 20 (0,2 µm, Millipore) en frascos de polipropileno y se incubó a 35°C bajo ligera agitación. El transcurso de la reacción se siguió por análisis HPLC. En cuanto se alcanzó el
30 final de la reacción, la solución de conversión se filtró ultradialmente por una membrana Pellikon 2 UDF (3k, Millipore) frente a PBS, 0,02% de Tween, y la concentración de proteína se ajustó a 0,1 mg/mL. El envasado tuvo lugar estérilmente en recipientes de vidrio a través de un filtro Millipore GV (0,22
35 µm) en porciones de 1 mL.

Analítica

El transcurso de la etapa de conversión se observó por RP-HPCL Tal como se ve en la Fig 4, al cabo de 5 días más del 90% de la proteína se había convertido en piroGlu-MCP-1, obteniéndose sorprendentemente, a pesar de la larga duración de la incubación, un grado de pureza muy alto del 95% (Tabla 3) Como se desprende de una comparación entre tandas con tampón fosfato 20 mM y aquellas con tampón fosfato 20 mM más 150 mM de sal (Ejemplo 1, Tabla 3, fila 3 a fila 6), la constante de velocidad relativamente baja en las tandas con PBS como solución de incubación se podría atribuir a la superior concentración salina, fuerza iónica u osmolaridad

Ejemplo 3 preparación de un medicamento en base al preparado de MCP-1 obtenido según el Ejemplo 1 o Ejemplo 2

El preparado de piroGlu-MCP-1 obtenido en el Ejemplo 1 o Ejemplo 2 se diluyó en PBS (cloruro de sodio, hidrógenofosfato disódico, cloruro de potasio, dihidrógenofosfato de potasio, pH 7,0) que contenía, además, 0,02% de Tween 20, hasta una concentración de 0,1 mg/mL y se envasó, a razón de un volumen de 1 mL, en recipientes de vidrio La solución medicamentosa acabada era transparente, incolora e inodora y se puede administrar por inyección o infusión

Ejemplo 4 comparación de la actividad biológica de piroGlu-MCP-1 y Gln-MCP-1

Principio de medición

MCP-1 se une al receptor de MCP-1 CCR2b y lo activa La activación del receptor conduce a un flujo de entrada de calcio en el citosol Éste se puede medir con un Fluorescence Imaging Plate Reader (FLIPR, Molecular Devices) Para ello, en células que expresan hCCR2b en su superficie se introduce el ester inactivo de coloración fluorescente Fluo-4 AM, el cual es escindido después por esterasas intracelulares En esta forma el

colorante de fluorescencia se une a iones Ca^{2+} . En el caso de una inducción con una longitud de onda de 488 nm se llega a una emisión con un máximo a 528 nm. La intensidad de la emisión depende de la concentración de calcio citosólico. Por lo tanto, la variación de intensidad de la luz emitida corre paralela con la concentración de calcio citosólico, la cual de nuevo depende del estado de activación del receptor.

Una característica señal de medida en función del tiempo después de la adición de MCP-1 se muestra en la Fig 5. A partir de ella se puede ver que tras la adición de MCP-1 se produce una rápida liberación de calcio, que va unida a una fuerte subida de la fluorescencia. En este caso, el máximo (b) se alcanza ya pocos segundos después de la aplicación (a). El espacio de tiempo entre la aplicación (a) y la estimulación máxima (b) es aproximadamente de 20-30 s.

En los ensayos descritos a continuación se efectuó la evaluación con ayuda de los valores máximos, puesto que éstos son menos influenciados por efectos secundarios tales como, por ejemplo, un flujo de entrada de calcio inducido por calcio y, con ello, se hace posible una medición más exacta.

Puesta a disposición de células CHO/hCCR2B-K1 de expresión estable

La región codificante del receptor CCR2B humano (nº de acceso D29984 del banco de genes) se amplificó a través de PCR. A continuación, el fragmento 1,08 kb BamHI-XbaI fue clonado en un vector de expresión. Con este plásmido que sirve como vector de expresión se transfectaron células CHO-K1.

Las células se cultivaron en un medio de cultivo a base de Ham F12 y fueron traspasadas regularmente. El día antes de la medición, 5000 células se extendieron en placas para ensayo de 384 pocillos (Corning Costar) con 40 µl de medio de cultivo y se dejaron adherir durante una noche (aproximadamente 24 h) a 37°C, 5% de CO_2 y 95% de humedad relativa. En todos los ensayos se llevaron a cabo determinaciones cuádruples.

El día del ensayo se prepararon primero las placas con

sustancia Como tampón de dilución para los diferentes preparados de MCP-1 se utilizó tampón Hanks con 0,1% de BSA (exento de proteasa) Como control ciego servía tampón Hanks con 0,1% de BSA A continuación se añadieron a las células 40 µl / pocillo de medio de tinción Fluo-4 y las tandas se incubaron durante 45 min a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa Después, las células teñidas se lavaron cuatro veces con 60 µl de tampón de lavado, quedando remanente un resto de 25 µl del tampón de lavado por cada pocillo Las células se incubaron después otros 5 min a la temperatura ambiente con tampón de lavado

Para la medida de la fluorescencia el aparato de medida FLIPR se ajustó de tal modo que los pocillos teñidos y los no teñidos se diferenciaban al menos por un factor 1 5, y los pocillos teñidos presentaban aproximadamente 11 000 conteos de fluorescencia Los demás ajustes de FLIPR eran

	excitación	488 nm
	emisión	510-570 nm (paso de banda)
	corrección negativa	Hanks/BSA (nivelación del control ciego
20	sustracción por	6 (= nivelado a 0 de todos los pocillos
	por desviación	antes de la adición de la sustancia)
	preimpregnado de	con 25 µl de la correspondiente solución
	los tipos	de sustancia a partir de la placa con
		sustancia (= minimación de un artefato
25		de adhesión)

El transcurso de la medición se componía de las siguientes etapas

- 6 intervalos al compás de 5 s
- 30 15 µl de sustancia añadida
- 60 intervalos al compás de 1 s
- 18 intervalos al compás de 5 s

Para la evaluación se utilizó la señal máxima de los 78 intervalos tras la adición de sustancia Como tandas de control servían

control ciego para la corrección negativa

control positivo (ATP) para el control del color
control de referencia ("estándar")

5

- control de la expresión del receptor sobre las células
- base de cálculo para determinar la actividad de muestras desconocidas

10

Las muestras a ensayar se pipetearon paralelamente con el control de referencia en idénticas etapas de dilución. Las concentraciones empleadas en los ensayos se eligieron de modo que se encontraban en la zona EC_{50} de la referencia de control

Comparación de preparados de MCP-1 conformes al invento y no conformes al invento

15

En el sistema de ensayo anteriormente indicado se ensayaron dos preparados de piroGlu-MCP-1 obtenidos según el procedimiento conforme al invento ("lote 071100kh" y "lote 0141921") y un preparado de MCP-1 obtenido por vía recombinante, cuyo radical glutamina N-terminal no se había convertido en un radical piroglutamato en la etapa de procedimiento anteriormente descrita (preparados de MCP-1 adquiribles de Peprtech), y se compararon. A partir de las curvas de medida tomadas como se describió anteriormente se obtuvo el valor EC_{50} (véase Fig 6)

20

Para los dos preparados de piroGlu-MCP-1 se obtuvieron valores EC_{50} prácticamente idénticos, mientras que los valores para el preparado de MCP-1 no conforme al invento, no modificado en el N-terminal, se desviaban claramente de ellos (Fig 6). El valor EC_{50} del último preparado resultó peor en un factor 2 a 3 (piroGlu-MCP-1 $EC_{50} = 7,82$ nM, preparado de MCP-1 de Peprtech $EC_{50} = 20,76$ nM)

30

A partir de esto, la actividad biológica de los dos preparados se calculó como sigue

35

Primero se llevó a cabo una corrección positiva sobre la piroGlu-MCP-1 en la concentración $1e-8$ M, es decir el valor conseguido a una concentración de 10 nM de piroGlu-MCP-1 se puso

en 100% Esto está en la zona casi lineal del ascenso de la curva Con ayuda de esta señal porcentual se calcula después la actividad de otros preparados, como por ejemplo de la MCP-1 de Peptotech, según la fórmula

5

$$\% \text{ de actividad}_{(\text{muestra})} = \text{RFU}_{(\text{muestra a } 1\text{e-8M})} \times 100\% / \text{RFU}_{(\text{estándar a } 1\text{e-8M})}$$

A partir de ello, en el ejemplo anterior, como muestra la Fig 4, para el preparado de MCP-1 no modificado en el N-terminal resulta un valor de la actividad del 48%, referido al preparado de piroGlu-MCP-1

10

Tabla 4

15 Valores de medida (corrección negativa Hanks/BSA, sustracción por desviación 6)

	Valor 1	Valor 2	Valor 3	Valor 4
piroGlu-MCP-1 (071100kh) a 1e-8M	12137,63	13919,36	12286,6	13249,68
MCP-1 (Peptotech) a 1e-8M	6216,81	6125,89	6836,11	5425,31

	Valor medio	SD
piroGlu-MCP-1 (071100kh) a 1e-8M	12898,3	727,8
MCP-1 (Peptotech) a 1e-8M	6151,0	500,2

20 $\% \text{ de actividad}_{(\text{MCP-1 (Peptotech)})} = 6151 \times 100\% / 12898,3 = 48\% \text{ de actividad}$

Ejemplo 5 Sensibilidad a la temperatura de piroGlu-MCP-1

25 piroGlu-MCP-1 se incubó 1 o, respectivamente, 2 horas a 56°C o 95°C La actividad biológica aún existente se midió después con ayuda del sistema de ensayo del Ejemplo 4

Se puso de manifiesto que tanto una incubación durante una hora como de dos horas de un preparado de piroGlu-MCP-1 a 56°C no causaba desnaturalización alguna Por el contrario, tal como muestra la Fig 7, la incubación a 95°C conducía a un efecto

30

desnaturalizante muy notorio

Ejemplo 6 tratamiento de pacientes que padecen una enfermedad arterial oclusiva

5

10 Para el tratamiento de pacientes de PAOD, un preparado de piroGlu-MCP-1 obtenido como anteriormente se ajusta a una concentración comprendida entre 1,2 y 120 µg/ml Inmediatamente antes de su uso, esta solución se lleva a una concentración final comprendida entre 0,1 a 10 µg/ml y se infunde al paciente intraarterialmente con un caudal de 2 a 12 ml/min durante un espacio de tiempo de 1 a 6 horas, cerca de la región afectada por la oclusión vascular La infusión se puede repetir al cabo de 1 a 7 días

Reivindicaciones

1 Procedimiento para la preparación de piroGlu-MCP-1 a partir de Gln-MCP-1 preparado por vía recombinante, en el cual Gln-MCP-1 se incuba

- 5 - a una temperatura en el intervalo de 30°C y 80°C
- en una solución tampón con
-- una concentración salina en el intervalo de 10 mM a 160 mM
y
-- un valor del pH en el intervalo de 2 a 7,5
10 hasta que al menos el 90% de la MCP-1 se presente en forma de piroGlu-MCP-1

2 Procedimientos según la reivindicación 1, en el que la solución tampón es un tampón fosfato con una concentración en el intervalo de 20 mM a 50 mM y con un valor del pH en el intervalo
15 de 3,5 a 6,5

3 Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 o 2, en el cual la solución tampón contiene adicionalmente un detergente, un antioxidante, un conservante, un estabilizante, un reactivo antimicrobiano y/o un formador de complejos

20 4 Procedimiento para la obtención de un preparado de piroGlu-MCP-1, que al menos comprende las etapas

- obtención de un preparado de Gln-MCP-1 por expresión en una célula huésped de una construcción génica codificante de MCP-1,
- concentración y/o purificación opcional de la Gln-MCP-1 del
25 preparado de Gln-MCP-1,
- conversión de la Gln-MCP-1 del preparado de Gln-MCP-1 en un preparado de piroGlu-MCP-1, el cual contiene piroGlu-MCP-1, según uno de los procedimientos 1 a 3, y
- trans-tamponación opcional y/o ulterior purificación del
30 preparado de piroGlu-MCP-1,
siendo la proporción de piroGlu-MCP-1 en el preparado de piroGlu-MCP-1 resultante de al menos 90%, referido al contenido total en MCP-1

5 Composición que contiene un preparado de piroGlu-MCP-1
35 obtenido según la reivindicación 4, en donde al menos el 90% de la MCP-1 contenida en el preparado de piroGlu-MCP-1 está en

forma de piroGlu-MCP-1

6 Procedimiento para la preparación de un medicamento que contiene piroGlu-MCP-1, en el cual se utiliza un preparado de piroGlu-MCP-1 obtenido según la reivindicación 4

5 7 Medicamento o composición farmacéutica que contiene un preparado de piroGlu-MCP-1 obtenido según la reivindicación 4, en donde al menos el 90% de la MCP-1 contenida en él está en forma de piroGlu-MCP-1

10 8 Medicamento o composición farmacéutica según la reivindicación 7, que contiene piroGlu-MCP-1 en un tampón fosfato con cloruro de sodio y, opcionalmente, un detergente como aditivo

15 9 Utilización de piroGlu-MCP-1 o de un preparado de piroGlu-MCP-1 obtenido según la reivindicación 4 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades vasculares oclusivas tales como especialmente enfermedades de las arterias coronarias (coronary artery disease, CAD), enfermedades oclusivas de las arterias periféricas (peripheral arterial occlusive disease, PAOD), enfermedades oclusivas de las
20 arterias cerebrales y mesenteriales

10 Preparado de MCP-1 obtenido por vía recombinante según el procedimiento conforme a la reivindicación 4, cuya actividad biológica referida a la de un preparado de MCP-1 preparado por vía recombinante, el cual no se sometió a ningún procedimiento
25 conforme a la reivindicación 1 (preparado de MCP-1 no modificada en el N-terminal) se encuentra en la relación 100 48 o mayor

11 Preparado de MCP-1 obtenido por vía recombinante, en el cual al menos el 90% de la proteína MCP-1 se presenta en forma de piroGlu-MCP-1

30 12 Preparado de MCP-1 según la reivindicación 11, en el cual la piroGlu-MCP-1 se presenta en forma no glicosilada

13 Procedimiento para la inducción de una reacción biológica o fisiológica, la cual sustituya o refuerce el efecto biológico o fisiológico de la proteína MCP-1 nativa endógena,
35 caracterizado porque una composición según la reivindicación 5 o un medicamento según la reivindicación 7 o un preparado según al

menos una de las reivindicaciones 10 a 12 se añade a células o tejidos u órganos en una cantidad adecuada para provocar el efecto biológico o fisiológico

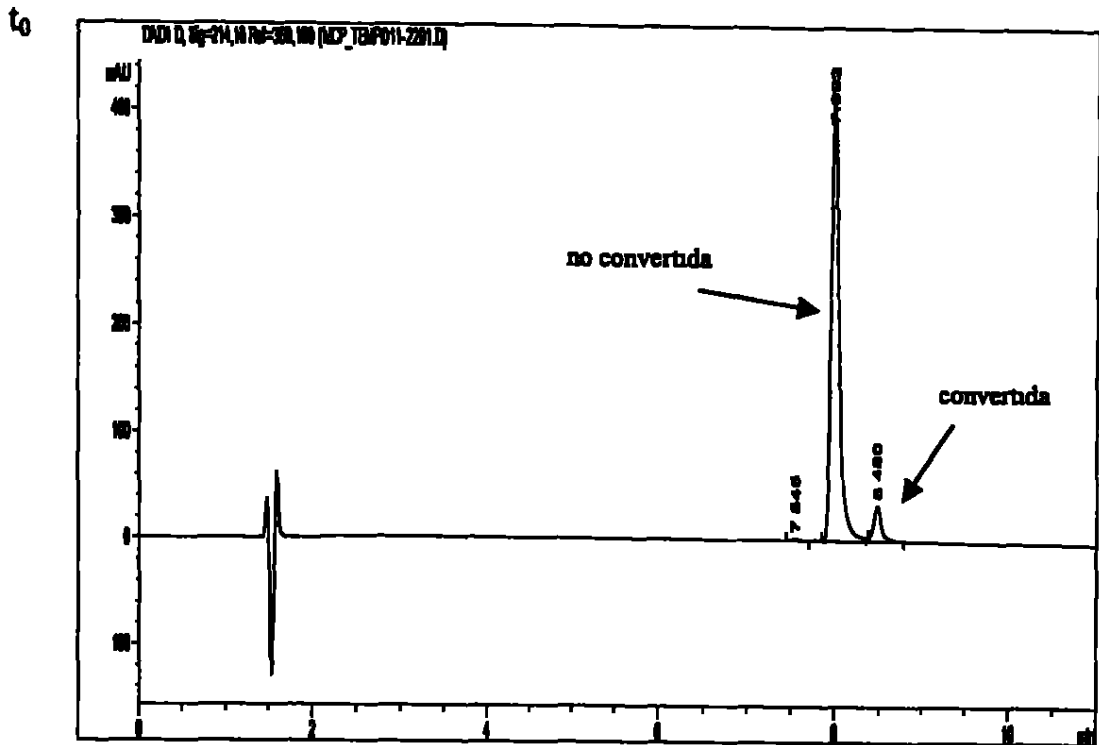
14 Procedimiento según la reivindicación 13, según el cual
5 las células o tejidos u órganos presentan receptores CCR-2 y/o CCR-4

15 Procedimiento según la reivindicación 14, según el cual las células son células de mamíferos, las cuales expresan de forma nativa o recombinante el subtipo CCR2, especialmente
10 CCR2b, del receptor de MCP-1

Resumen

El invento se refiere a un procedimiento para la preparación de piroGlu-MCP-1 a partir de Gln-MCP-1 preparado por
5 vía recombinante, en el cual Gln-MCP-1 se incubaba a una temperatura en el intervalo de 30°C y 80°C en una solución tampón con una concentración salina en el intervalo de 10 mM a 160 mM y un valor del pH en el intervalo de 2 a 7,5, hasta que al menos el 90% de la MCP-1 se presente en forma de piroGlu-MCP-1

1/8



24 h

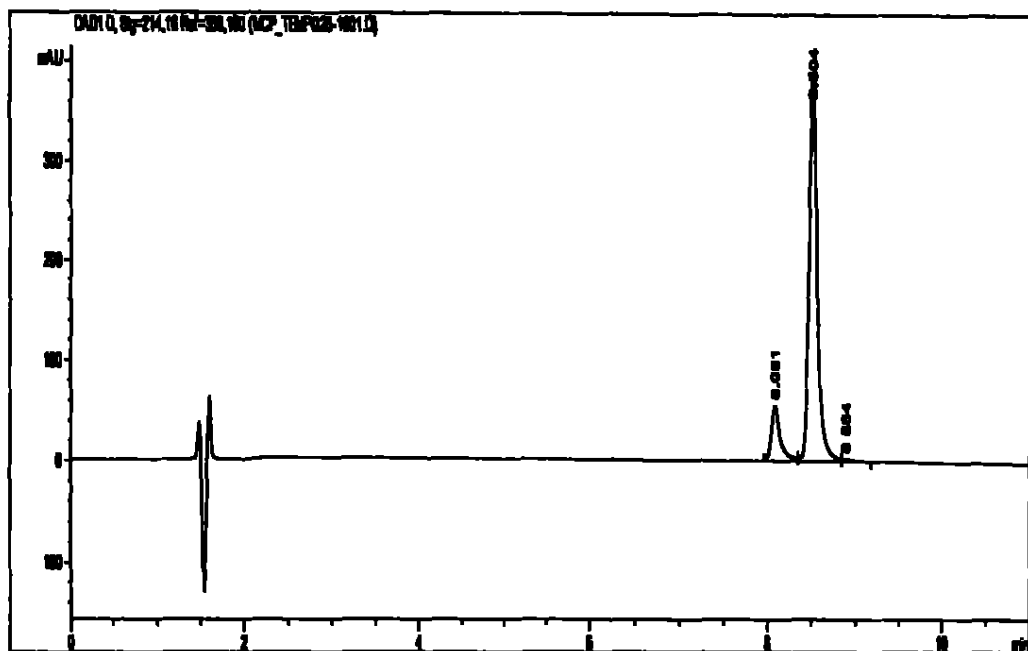
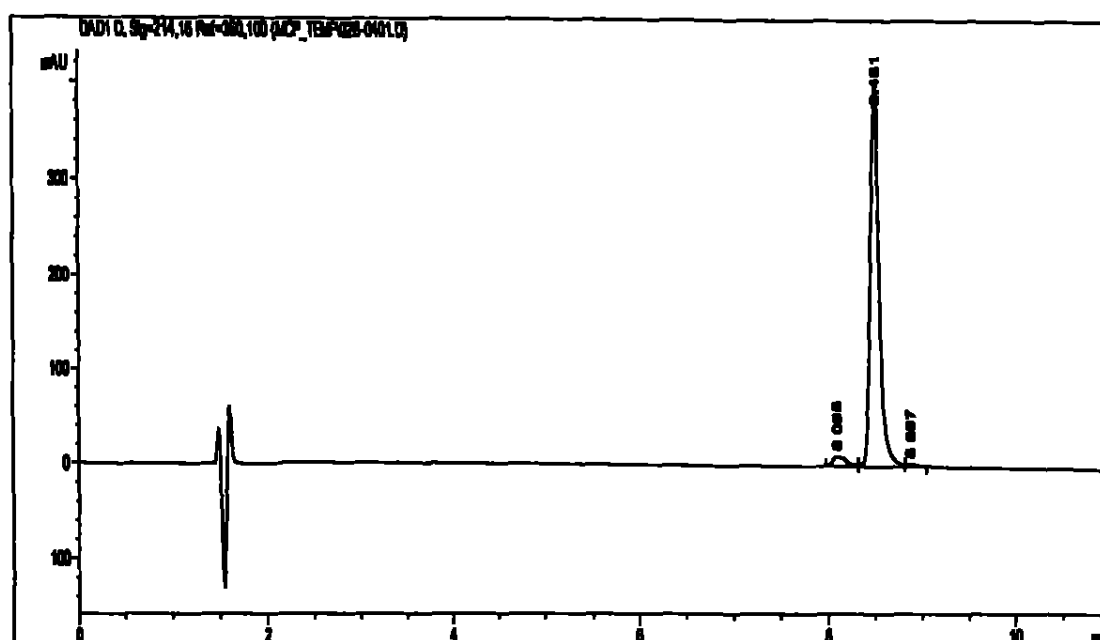


FIG. 1

2/8

48 h



120 h

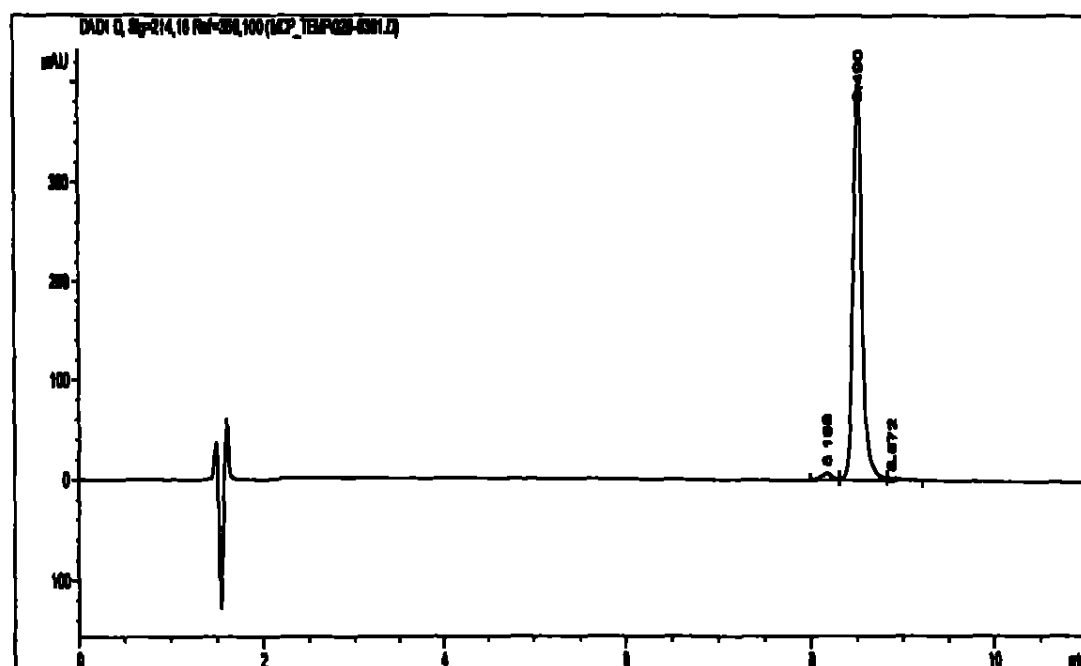


FIG. 1 (continuación)

3/8

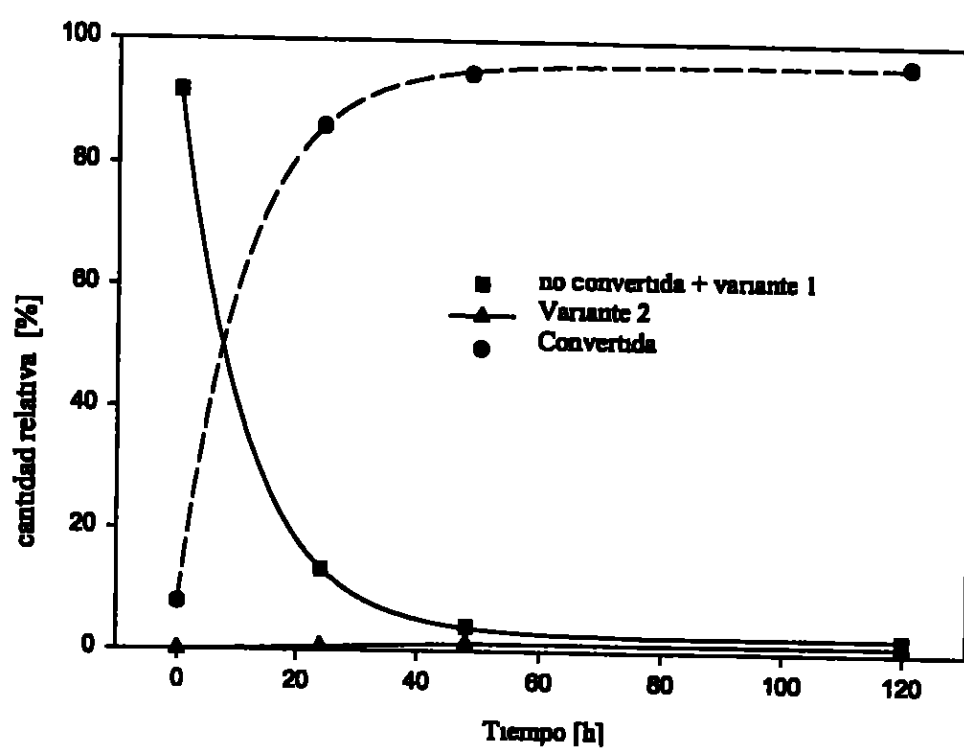
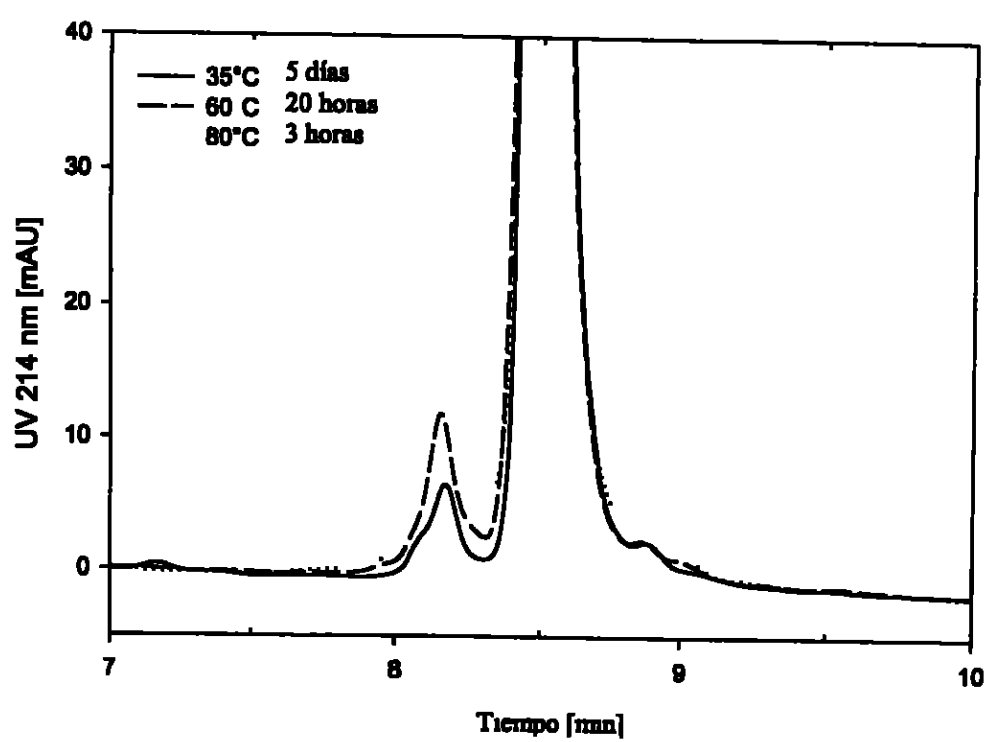
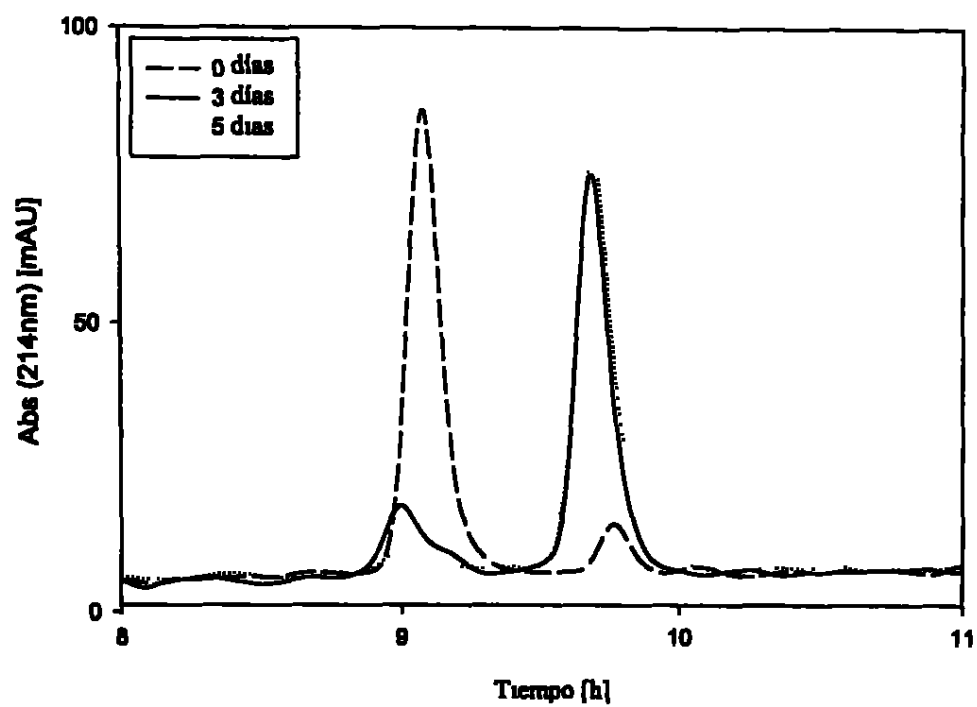


FIG. 2

**FIG. 3**

5/8

**FIG. 4**

SA, 30000

6/8

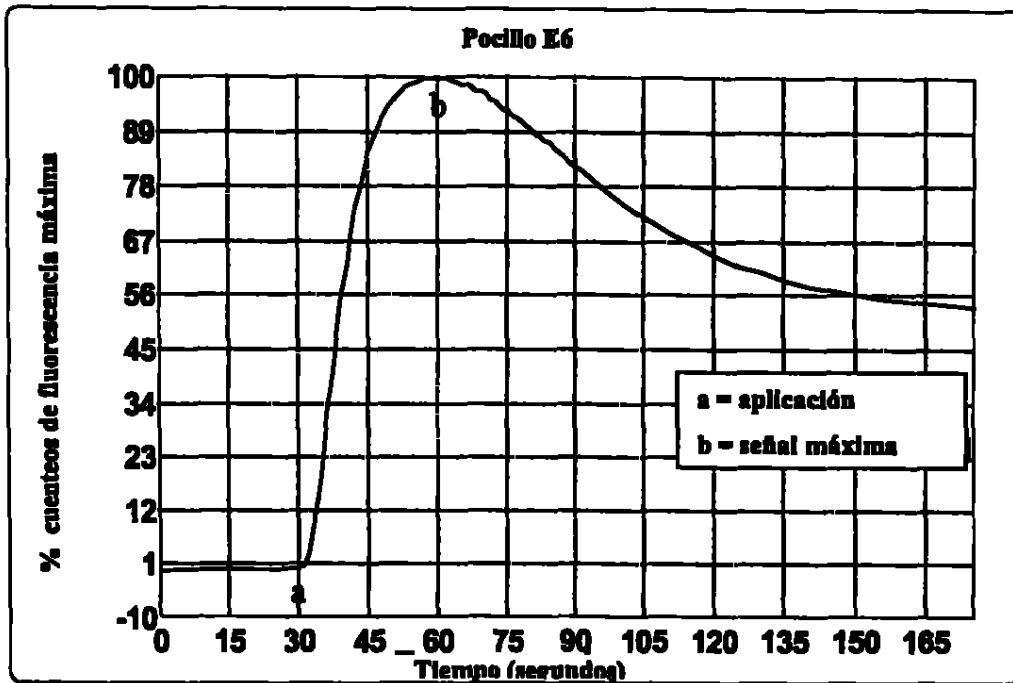


FIG. 5

Comparación piroGlu MCP-1
(Ch 071100kh) con MCP-1
(Peprotech)

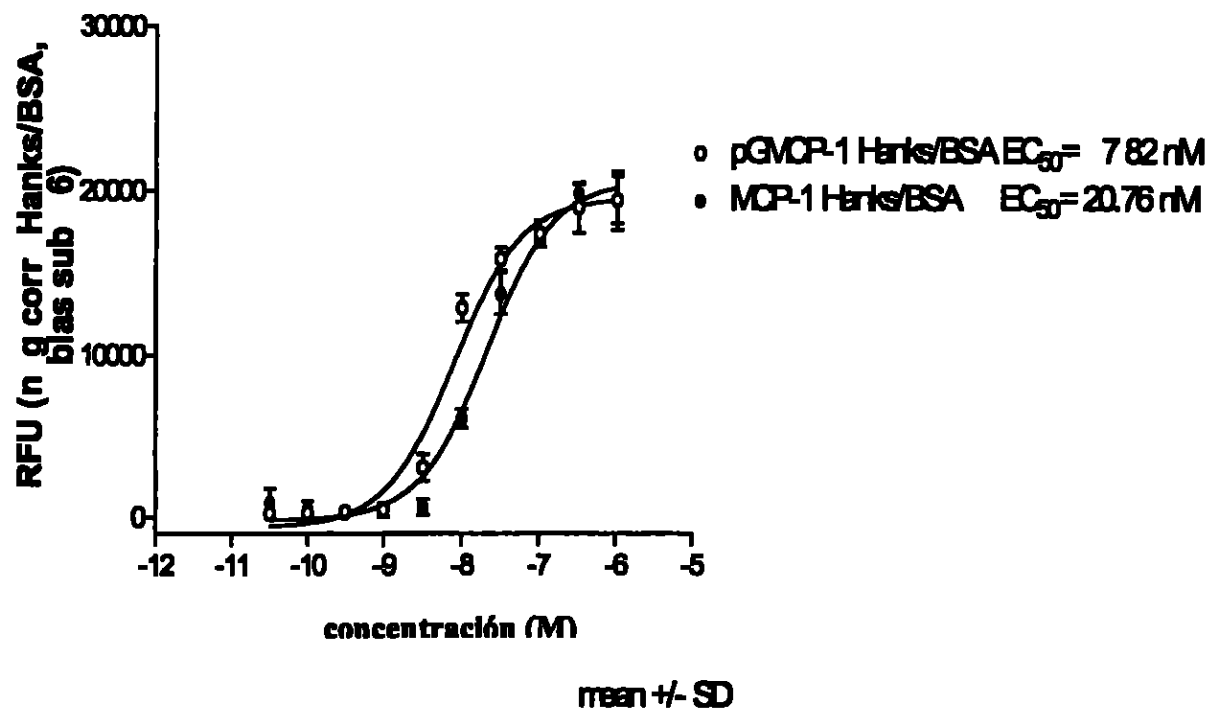
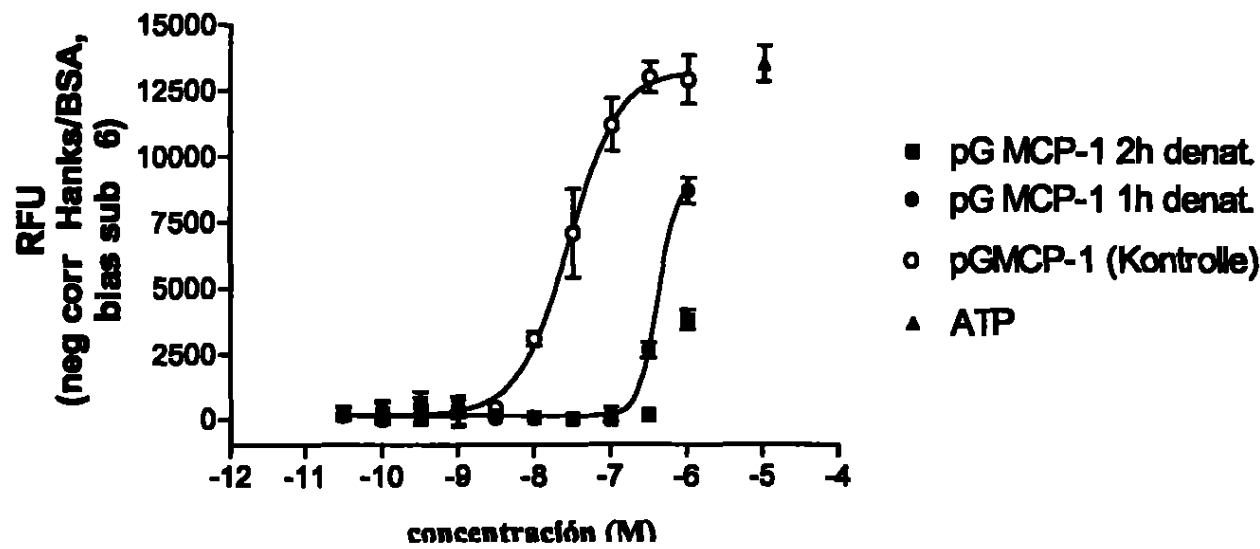


FIG. 6

Comparación con piroGlu MCP-1
desnaturalizada
(95°C durante 1 o 2 horas)



mean +/- SD

FIG. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/003856

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/52 C12N15/19 A61K38/19 A61P9/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 714 578 A (APPELLA ETTORE ET AL) 3 February 1998 (1998-02-03) cited in the application	5-8, 10-15
Y	* das gesamte Dokument, besonders Spalten 1-3, 25, 26, Beispiele III-VII, Tabelle VI sowie Ansprüche 1 und 2 *	9
X	US 6 090 795 A (YOSHIMURA ET AL) 18 July 2000 (2000-07-18)	5-8, 10-15
Y	column 1 - column 2, claims 1-15, examples 1, 3	9
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
Special categories of cited documents A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance E earlier document but published on or after the international filing date L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, each combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 6 July 2004		Date of mailing of the international search report 30/08/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Facs (+31-70) 340-3018		Authorized officer Schmidt, Harald

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/003856

C-(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VOSKUIL M ET AL "Modulation of collateral artery growth in a porcine hindlimb ligation model using MCP-1" AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY, vol 284, no 2(2), April 2003 (2003-04), pages H1422-H1428, XP008021581 the whole document	9
Y	US 6 383 782 B1 (BARRATT DEREK GRAHAM ET AL) 7 May 2002 (2002-05-07) column 1, examples 1,2, sequence 32	9
A	VAN COILLIE E ET AL "Functional Comparison of Two Human Monocyte Chemotactic Protein-2 Isoforms, Role of the Amino-Terminal Pyroglutamic Acid and Processing by CD26/Dipeptidyl Peptidase IV" BIOCHEMISTRY, vol 37, 1998, pages 12672-12680, XP002253472 cited in the application page 12673 - page 12674	1-4
A	BLASZCZYK J ET AL "Complete Crystal Structure of Monocyte Chemotactic Protein-2, a CC Chemokine that Interacts with Multiple Receptors" BIOCHEMISTRY, vol 39, 2000, pages 14075-14081, XP002253471 page 14075 - page 14076	
A	ISHII K ET AL "Full active baculovirus-expressed human monocyte chemoattractant protein 1 with the intact N-terminus" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol 206, no 3, 1995, pages 955-961, XP002253473 page 956	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP2004/003856

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

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

- 1 ☒ Claims Nos.
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely
Although claims 13 to 15 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition
- 2 ☐ Claims Nos.
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3 ☐ Claims Nos.
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6 4(a)

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP2004/003856

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5714578	A	03-02-1998	AU 5048090 A	24-08-1990
			CA 2006964 A1	31-07-1990
			WO 9008777 A1	09-08-1990
			AU 5160390 A	24-08-1990
			WO 9008778 A1	09-08-1990
			US 5532144 A	02-07-1996
			US 6090795 A	18-07-2000
US 6090795	A	18-07-2000	US 5532144 A	02-07-1996
			AU 5048090 A	24-08-1990
			AU 5160390 A	24-08-1990
			CA 2006964 A1	31-07-1990
			WO 9008777 A1	09-08-1990
			WO 9008778 A1	09-08-1990
			US 5714578 A	03-02-1998
US 6383782	B1	07-05-2002	AU 8453598 A	16-02-1999
			EP 0998564 A1	10-05-2000
			WO 9905279 A1	04-02-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/003856

A. KLASSEIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS
IPK 7 C07K:4/52 C12N15/19 A61K38/19 A6:P9/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE QUELLEN
Recherche der Mindestprüfung (PClassifikationssystem und Klassifikationssysteme)
IPK 7 C07K C12N A61K

Recherche der oder nicht zum Mindestprüfung gehörenden Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Quellen fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe):
EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data

C. A.5 WESSENTLICH ANGEBORENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 714 578 A (APPELLA ETTORE ET AL) 3 Februar 1998 (1998-02-03) in der Anmeldung erwähnt	5-8, 10-15
Y	* das gesamte Dokument, besonders Spalten 1-3, 25, 26, Beispiele III-VII, Tabelle VI sowie Ansprüche 1 und 2 *	9
X	JS 6 090 795 A (YOSHIMURA ET AL) 18 Juli 2000 (2000-07-18)	5-8, 10-15
Y	Spalte 1 - Spalte 2, Ansprüche 1-15, Beispiele 1, 3	9
	----- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Field C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E' Abstrakt Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

G' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft zu machen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen in Recherchebericht genannter Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie angegeben)

H' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Vorlesung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

I' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

** Besondere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

*' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindungsfähig befunden betrachtet werden

**' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindungsfähig beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann offensichtlich ist

Δ Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche
6 Juli 2004

Abgeschlossenheit des internationalen Rechercheberichts
30/08/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchebehörde
Europäisches Patentamt, P.O. Box 1, Patenthaus 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31) 70 340 8040, Fax (+31) 70 340 8041
Fax (+31) 70 340 8018

Befugmächter der Recherche
Schniedt, Harald

Formular PCT/ISA/210 (Blatt 1), Januar 2004

C.(Fortsetzung) ALS WESSENTLICH ANGEFÜHRTE LITERATUR

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit notwendig unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Seit. Anspruch Nr.
Y	YOSKUIL M ET AL "Modulation of collateral artery growth in a porcine hindlimb ligation model using MCP-1" AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY, Bd 284, Nr 2(2), April 2003 (2003-04), Seiten H1422-H1428, XP008021581 das ganze Dokument	9
Y	US 6 383 782 B1 (BARRATT DEREK GRAHAM ET AL) 7 Mai 2002 (2002-05-07) Spalte 1, Beispiele 1,2, Sequenz 32	9
A	VAN COILLIE E ET AL "Functional Comparison of Two Human Monocyte Chemotactic Protein-2 Isoforms, Role of the Amino-Terminal Pyroglutamic Acid and Processing by CD26/Dipeptidyl Peptidase IV" BIOCHEMISTRY, Bd 37, 1998, Seiten 12672-12680, XP002253472 in der Anmeldung erwähnt Seite 12673 - Seite 12674	1-4
A	BLASZCZYK J ET AL "Complete Crystal Structure of Monocyte Chemotactic Protein-2, a CC Chemokine that Interacts with Multiple Receptors" BIOCHEMISTRY, Bd 39, 2000, Seiten 14075-14081, XP002253471 Seite 14075 - Seite 14076	
A	ISHII K ET AL "Full active baculovirus-expressed human monocyte chemoattractant protein 1 with the intact N-terminus" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Bd 206, Nr 3, 1995, Seiten 955-961, XP002253473 Seite 956	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/003856

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich:
Obwohl die sich die Ansprüche 13 bis 15 auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine einwolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich:
3. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden könnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen enthalten: _____.

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs:

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/003856

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5714578	A	03-02-1998	AU 5048090 A	24-08-1990
			CA 2006964 A1	31-07-1990
			WO 9008777 A1	09-08-1990
			AU 5160390 A	24-08-1990
			WO 9008778 A1	09-08-1990
			US 5532144 A	02-07-1996
			US 6090795 A	18-07-2000
US 6090795	A	18-07-2000	US 5532144 A	02-07-1996
			AU 5048090 A	24-08-1990
			AU 5160390 A	24-08-1990
			CA 2006964 A1	31-07-1990
			WO 9008777 A1	09-08-1990
			WO 9008778 A1	09-08-1990
			US 5714578 A	03-02-1998
US 6383782	B1	07-05-2002	AU 8453598 A	16-02-1999
			EP 0998564 A1	10-05-2000
			WO 9905279 A1	04-02-1999

Absender INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

An

siehe Formular PCT/ISA/220

PCT

SCHRIFTLICHER BESCHIED DER
INTERNATIONALEN
RECHERCHENBEHÖRDE
(Regel 43bis 1 PCT)

Absenddatum

(Tag/Monat/Jahr) siehe Formular PCT/ISA/210 (Blatt 2)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
siehe Formular PCT/ISA/220WEITERES VORGEHEN
siehe Punkt 2 untenInternationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/003856Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
13 04 2004Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
02 05 2003Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK
C07K14/52 C12N15/19 A61K38/19, A61P9/00Anmelder
BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

1 Dieser Bescheid enthält Angaben zu folgenden Punkten

- ☒ Feld Nr. I Grundlage des Bescheids
- ☐ Feld Nr. II Priorität
- ☒ Feld Nr. III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfindersche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- ☐ Feld Nr. IV Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- ☒ Feld Nr. V Begründete Feststellung nach Regel 43bis 1(a)(i) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderschen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit, Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- ☐ Feld Nr. VI Bestimmte angeführte Unterlagen
- ☐ Feld Nr. VII Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- ☐ Feld Nr. VIII Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

2 WEITERES VORGEHEN

Wird ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt, so gilt dieser Bescheid als schriftlicher Bescheid der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde ("IPEA"), dies trifft nicht zu, wenn der Anmelder eine andere Behörde als diese als IPEA wählt und die gewählte IPEA dem internationalen Büro nach Regel 88 1bis b) mitgeteilt hat, daß schriftliche Bescheide dieser internationalen Recherchenbehörde nicht anerkannt werden.

Wenn dieser Bescheid wie oben vorgesehen als schriftlicher Bescheid der IPEA gilt, so wird der Anmelder aufgefordert, bei der IPEA vor Ablauf von 3 Monaten ab dem Tag, an dem das Formblatt PCT/ISA/220 abgesandt wurde oder vor Ablauf von 22 Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft, eine schriftliche Stellungnahme und, wo dies angebracht ist, Änderungen einzureichen.

Weitere Optionen siehe Formblatt PCT/ISA/220

3 Nähere Einzelheiten siehe die Anmerkungen zu Formblatt PCT/ISA/220

Name und Postanschrift der mit der internationalen
Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk, Pays Bas
Tel. +31 70 340 2040 Tx. 31 651 epo nl
Fax +31 70 340 3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schmidt, Harald

Tel. +31 70 340-4023



Feld Nr 1 Grundlage des Bescheids

- 1 Hinsichtlich der **Sprache** ist der Bescheid auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache erstellt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist
- ☐ Der Bescheid ist auf der Grundlage einer Übersetzung aus der Originalsprache in die folgende Sprache erstellt worden, bei der es sich um die Sprache der Übersetzung handelt, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (gemäß Regeln 12.3 und 23.1 b))
- 2 Hinsichtlich der **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz**, die in der internationalen Anmeldung offenbart wurde und für die beanspruchte Erfindung erforderlich ist, ist der Bescheid auf folgender Grundlage erstellt worden
- a Art des Materials
- ☐ Sequenzprotokoll
- ☐ Tabelle(n) zum Sequenzprotokoll
- b Form des Materials
- ☐ in schriftlicher Form
- ☐ in computerlesbarer Form
- c Zeitpunkt der Einreichung
- ☐ in der eingereichten internationalen Anmeldung enthalten
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht
- ☐ bei der Behörde nachträglich für die Zwecke der Recherche eingereicht
- 3 ☐ Wurden mehr als eine Version oder Kopie eines Sequenzprotokolls und/oder einer dazugehörigen Tabelle eingereicht, so sind zusätzlich die erforderlichen Erklärungen, daß die Information in den nachgereichten oder zusätzlichen Kopien mit der Information in der Anmeldung in der eingereichten Fassung übereinstimmt bzw. nicht über sie hinausgeht, vorgelegt worden
- 4 Zusätzliche Bemerkungen

Feld Nr. III) Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu auf erfinderscher Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung
- ☒ Ansprüche Nr. 13-15 (hinsichtlich der gewerblichen Anwendbarkeit)

Begründung

- ☒ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 13-15 (hinsichtlich der gewerblichen Anwendbarkeit) beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*)

siehe Beiblatt

- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie bitte nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*)
- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte
- ☐ für die gesamte Anmeldung oder für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt
- ☐ Das Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzprotokoll entspricht nicht dem in Anhang C zu den Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard, weil
 - die schriftliche Form ☐ nicht eingereicht wurde
 - ☐ nicht dem Standard entspricht
 - die computerlesbare Form ☐ nicht eingereicht wurde
 - ☐ nicht dem Standard entspricht
- ☐ Die Tabellen zum Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzprotokoll, sofern sie nur in computerlesbarer Form vorliegen, entsprechen nicht den in Anhang C-bis zu den Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen technischen Anforderungen
- ☐ Siehe Beiblatt für weitere Angaben

Feld Nr. V Begründete Feststellung nach Regel 43b/s 1(a)(i) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit, Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1 Feststellung

Neuheit	Ja	Ansprüche 1-4,9
	Nein	Ansprüche 5-8,12-15
Erfindersche Tätigkeit	Ja	Ansprüche 1-4
	Nein	Ansprüche 5-15
Gewerbliche Anwendbarkeit	Ja	Ansprüche 1-12
	Nein	Ansprüche

2 Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

Zu Punkt III**Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit**

Die Ansprüche 13 bis 15 beziehen sich auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67 1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieser Ansprüche kein Gutachten erstellt (Artikel 34(4) a) (i) PCT).

Zu Punkt V**Begründete Feststellung hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit, Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1 US 5 714 578 A (APPELLA ETTORE ET AL) 3. Februar 1998 (1998-02-03) in der Anmeldung erwähnt

D2 VAN COILLIE E ET AL "Functional Compansion of Two Human Monocyte Chemotactic Protein-2 Isoforms, Role of the Amino-Terminal Pyroglutamic Acid and Processing by CD26/Dipeptidyl Peptidase IV" BIOCHEMISTRY, Bd. 37, 1998, Seiten 12672-12680, XP002253472 in der Anmeldung erwähnt

D3 VOSKUIL M ET AL "Modulation of collateral artery growth in a porcine hindlimb ligation model using MCP-1" AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY, Bd. 284, Nr. 2(2), April 2003 (2003-04), Seiten H1422-H1428, XP008021581

Neuheit

Das Dokument D1 offenbart pharmazeutische Zubereitungen, die rekombinant hergestelltes pyroGlu-MCP-1 enthalten und Verfahren zur therapeutischen Behandlung, in denen pyroGlu-MCP-1 verabreicht wird (siehe Seiten 25, 26 und Ansprüche 1 und 2, sowie die Beispiele).

Da davon ausgegangen wird, dass sich die pyroGlu-MCP-1-Zubereitungen aus D1 nicht

von denen der vorliegenden Anmeldung unterscheiden, ist der Gegenstand der Ansprüche 5-8 und 10-15 nicht neu im Sinne des Artikels 33(2) PCT

Erfinderische Tätigkeit

Das Dokument D1 wird als nächster Stand der Technik für den Gegenstand der Ansprüche 1 bis 4 angesehen und offenbart ein Verfahren zur Herstellung von rekombinantem pyroGlu-MCP-1, das als die biologisch aktive Form bekannt ist. Es wird hinsichtlich des rekombinanten pyroGlu-MCP-1 nicht angegeben, unter welchen Temperatur- oder Pufferbedingungen gearbertet wird.

Der Gegenstand der Ansprüche 1 bis 4 unterscheidet sich dadurch, dass die Inkubation bei einer Temperatur im Bereich von 30° bis 80°C in einem salzhaltigen Puffer in einem pH-Bereich von 2,0 bis 7,5 erfolgt.

Das durch die Ansprüche 1 bis 4 zu lösende Problem wird darin gesehen, ein verbessertes Verfahren zur Herstellung von MCP-1-Zubereitungen (d.h. Zubereitungen mit einem hohen Gehalt an pyroGlu-MCP-1) zur Verfügung zu stellen.

Die Lösung besteht darin, die Inkubation bei einer erhöhten Temperatur bei einem pH-Wert von 2,0 bis 7,5 durchzuführen, um Gln-1 zu zyklisieren.

Eine ähnliche Lösung wird in dem Dokument D2 für MCP-2 vorgeschlagen, das bei 37°C und einem pH-Wert von 8,0 inkubiert wird, um Gln-1 zu zyklisieren und damit die chemotaktische Aktivität zu induzieren (siehe Seite 12673 und Seite 12674, linke Spalte).

Für den Fachmann ist es allerdings nicht offensichtlich, auch MCP-1 bei erhöhten Temperaturen und in einem niedrigen pH-Bereich von 2,0 bis 7,5 zu inkubieren, um biologisch aktives pyroGlu-MCP-1 zu erhalten.

Daher wird dem Gegenstand der Ansprüche 1 bis 4 eine erfindersche Tätigkeit nach Artikel 33(3) zugesprochen.

Das Dokument D3 wird als nächster Stand der Technik für den Gegenstand des Anspruches 9 angesehen und offenbart die Verwendung von MCP-1 in der Behandlung von Gefäßverschlusskrankheiten (siehe Zusammenfassung).

Da beispielsweise aus D1 bekannt ist, dass pyroGlu-MCP-1 die biologisch aktive Substanz ist, ist es für den Fachmann offensichtlich, die Verbindung zu verwenden, um das Problem zu lösen.

Daher ist der Gegenstand des Anspruches 9 nicht erfindersch im Sinne des Artikels 33(3) PCT.

Gewerbliche Anwendbarkeit

Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 13 bis 15 gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an, es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

213
112

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT B00176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 05122775 00000000 Folios 113
Fecha (GMS): 2005-12-02 17:22:12
Tramite : 011 PCT-PATENT 378 FASE MACI 411 PRESENTAC
Dependencia 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA 05 - 81,677
FECHA OCTUBRE 24 DE 2005

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No PAGO	FECHA PGO	Vr PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	31356195	24/10/2005	38,640,040 00

***** CONCEPTO *****

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL DE PATENTE DE IN	443,000 00
		TOTAL	\$ 443,000 00

SDM CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No _____

06 09255-841-0293

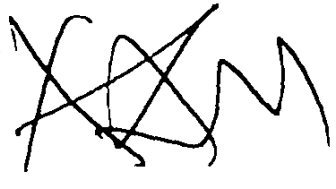
114 113

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION	()	☒
MODELO DE UTILIDAD	()	☒
- Indicacion de que se solicita la concesion de una patente	()	☒
- Datos de identificacion del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud	()	☒
- Descripcion de la invencion	()	☒
- Dibujos de ser estos pertinentes	()	☒
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas	()	☒
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicacion de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificacion del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
- Representacion grafica o fotografica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicacion de que solicita el registro de un Esquema de trazado	()	()
- Datos de Identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud	()	()
- Representacion grafica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable 

Fecha

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radacion: 85122775 00000000 Folios 113
Fecha (AÑO) 2005-12-02 17:22:13
Tramite : 011 PCT-PATENT 376 FASE NACT 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES