

UEXKÜLL & STOLBERG PartmbB | Beselerstr. 4 | D-22607 Hamburg

Electronic Filing

European Patent Office

80298 München

Application No.: PCT/EP2023/064899
Applicant: Boehringer Ingelheim International GmbH
Our File: P 115623

April 2, 2024
Gu/Gu

Letter accompanying the Amendments under Article 34 PCT

By means of the attached Form PCT/IPER/401 Applicant requests International Preliminary Examination (PCT Chapter II).

The examination shall be carried out on the basis of the amended claims 1-47 filed herewith.

The below comments are provided in response to the objections stated in the Written Opinion dated 15th September 2023.

1. Amendments

- 1.1 The following amendments have been made in consideration of the objections raised by the International Searching Authority (ISA) in the Written Opinion:

HAMBURG

Beselerstr. 4
D-22607 Hamburg
+49 40 899 654 - 0 | Fax - 88

**European Patent Attorneys
European Trademark Attorneys
Patentanwälte**

Dr. Johannes Ahme
Dr. Heinz-Peter Muth, LL.M.
Dr. Bernd Janssen, LL.M.
Dr. Albrecht von Menges
Dr. Martin Nohlen
Dr. André Guder
Dr. Fabian Müller
Dipl.-Chem. Alexander Eisenführ
Dipl.-Ing. Philipp Kühn
Dipl.-Wirtsch.-Ing. Martin Jacob
Dr. Hanna Pieper
Dr. Johannes Heidemann

Rechtsanwälte

Dr. Frank Dettmann
Dr. Alexander Thünken, LL.M.*
*Fachanwalt für Gewerbl. Rechtsschutz

MÜNCHEN

Maria-Theresia-Str. 13
D-81675 München
+49 89 290 917 - 0 | Fax - 88

**European Patent Attorneys
European Trademark Attorneys
Patentanwälte**

Dipl.-Ing. Lars Manke
Dr. Anatol Spork
Dr. Nils Lindenmaier

**Uexküll & Stolberg Partnerschaft
von Patent- und Rechtsanwälten mbB**

Amtsgericht Hamburg, PR 1062
Steuer-Nr.: 42/664/01243
USt-IdNr./VAT-No.: DE 118 166 268

info@uex.de

www.uex.de

- In claim 1, it has been specified that the host cell is a bacterial host cell. Support for the amendment can be found in former claim 15.
- Former claims 14-15 and 45 have been deleted.
- All remaining claims have been renumbered where necessary and their back-references have been adapted.

- 1.2 It is directly evident that the amendments do not introduce subject matter that extends beyond the disclosure of the application as filed. Accordingly, the requirements of Article 34(2)(b) PCT are met.
- 1.3 Further, the amendments are not to be construed as giving up subject matter that is no longer covered by the claims.

2. Novelty - Article 33(2) PCT

- 2.1 With respect to original claims 1-50, the ISA found that none of the recited documents D1-D2 anticipates the subject matter of these claims. The same necessary holds true for the amended claims 1-47 submitted herewith.
- 2.2 The subject-matter of newly filed claims 1-47 is therefore novel in accordance with Article 33(2) PCT.

3. Inventive Step - Article 33(3) PCT

- 3.1 The subject method of former method claims 1-23, which corresponds to newly filed claims 1-21, has been correctly found to be inventive in view of the prior art cited by the ISA.
- 3.2 On the other hand, former claims 24-50 were considered to lack inventive step. The ISA has correctly stated that the subject matter of claim 1 differs from the disclosure of D1 in that the MYDGF protein exerts an additional alanine or serine residue at its N-terminus. However, the ISA then incorrectly concluded in item 2.4 of the Written Opinion that no technical effect is linked to said difference.
- 3.3 Although the ISA acknowledges that a MYDGF protein having an additional alanine or serine residue at its N-terminus results in higher yields and improved recovery from

inclusion bodies, it is stated that this effect is not linked to the MYDGF protein *per se*, but instead is only achieved upon expression of the protein in *E. coli*. Applicant respectfully disagrees. It is evident from the working examples of the application as filed that it is the modification at the N-terminus of the MYDGF protein which results in the high yield and recovery. Furthermore, the modified MYDGF proteins exhibit a surprisingly low degree of chemical and post-translational modifications compared to the wild-type MYDGF protein that consists of only 142 amino acids. Reference is made in this regard to Tables 8 and 12 of the description. Accordingly, it is more than plausible to assume that technical effect described in the present application is based on the modified protein as such.

- 3.4 But even when assuming for the sake of argument that the technical effect is achieved only when expressing the protein in a bacterial host cell, the objection of the ISA would be moot in view of the amendments that were made in the claims. It must be noted that claim 1 as amended specifies that the expression is performed in a bacterial host cell. Accordingly, product-by-process claim 22 as amended, by virtue of its back-reference to claim 1, likewise refers to protein expression in a bacterial host cell.
- 3.5 It follows from the foregoing that former claims 24-50, which correspond to claims 22-47, are based on an inventive step, as required by Article 33(3) PCT. Withdrawal of the objections is respectfully requested.

4. Clarity – Article 6 PCT

- 4.1 The new claims are clear and concise and therefore comply with the requirements of Article 6 PCT.
- 4.2 As explained above, claim 1 has been amended by specifying that the host cell is a bacterial cell. Accordingly, the clarity objection in item 3.1 of the Written Opinion has been overcome.
- 4.3 The ISA further argued in relation to claim 1 that the claim seeks to define the matter for which protection is sought by a result to be achieved. Applicant respectfully disagrees. As outlined at the end of page 23 of the application text, maturation is effectively achieved by aminopeptidases which occur in the host cell. Accordingly, no additional steps are required in claim 1 to arrive at the mature MYDGF protein of 143 amino acids. Instead, maturation occurs automatically after expression of the protein.

4.4 Finally, the objection in item 3.4 of the Written Opinion claim is moot in view of the deletion of original claim 45.

5. Requests

5.1 Issuance of a favorable International Preliminary Examination Report (IPER) is requested in consideration of the arguments and amendments submitted herewith.

5.2 In case it is intended to maintain any of the previous objections, issuance of a second Written Opinion or consultation by telephone is respectfully requested.

- signed electronically -

André Guder
(Association No. 1)

Encls.: New claims 1-47 (clean version)
 New claims 1-47 (annotated version)

P 115623

- 1 -

NEW CLAIMS

1. Method for the recombinant expression of a MYDGF protein in a bacterial host cell, comprising
 - (a) providing a host cell that comprises a nucleic acid encoding a protein which after maturation consists of 143 amino acids having the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2;
 - (b) culturing the host cell under conditions that allow the expression of the protein;
 - (c) isolating inclusion bodies containing MYDGF protein from the host cell; and
 - (d) solubilising the inclusion bodies and refolding the MYDGF protein.
2. Method of claim 1, wherein step (a) comprises
 - (i) providing a host cell that comprises a nucleic acid that contains an open reading frame, flanked by start and stop codon, according to the sequence of SEQ ID NO:11 or SEQ ID NO:12, and preferably according to the sequence of SEQ ID NO:11, operably linked to a promotor; or
 - (ii) providing a host cell that comprises a nucleic acid encoding a protein which before maturation consists of 144 amino acids having the amino acid sequence of SEQ ID NO:15 or SEQ ID NO:16, and preferably the amino acid sequence of SEQ ID NO:15.
3. Method of any of claims 1-3, wherein step (a) comprises providing a host cell that comprises a nucleic acid of SEQ ID NO:7 or SEQ ID NO:8, and preferably a nucleic acid of SEQ ID NO:7.
4. Method of any of claims 1-3, wherein said maturation is the removal of the N-terminal methionine residue.
5. Method of claim 4, wherein said removal of the N-terminal methionine residue is effected by one or more host cell-derived aminopeptidases.
6. Method of any of claims 1-5, further comprising (e) obtaining after step (d) a refolded MYDGF protein of 143 amino acids having the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2, and preferably the amino acid sequence of SEQ ID NO:1.

– 2 –

7. Method of any of claims 1-6, wherein refolding of the protein in step (d) comprises the incubation of the protein in the presence of urea.
8. Method of any of claims 1-7, wherein said method further comprises (f) purifying the MYDGF protein.
9. Method of claim 8, wherein step (f) comprises ultrafiltration, diafiltration, hydrophobic interaction chromatography and/or anion ion exchange chromatography.
10. Method of claim 9, wherein anion exchange chromatography or hydrophobic interaction chromatography step is performed by contacting the MYDGF protein to the chromatography resin material under conditions that allow for the adsorption of the MYDGF protein to the resin, optionally washing the resin, and eluting the MYDGF protein from the resin.
11. Method of claim 10, wherein the adsorption of the MYDGF protein to the anion exchange chromatography resin is performed under conditions of low ionic strength.
12. Method of claim 11, wherein adsorption is performed at a conductivity of less than 3 mS/cm, less than 2 mS/cm, less than 1,5 mS/cm or less than 1mS/cm.
13. Any method of any of claims 9-12, wherein desorption of the MYDGF protein from the anion exchange resin is effected by increasing the salt concentration and/or lowering the pH of the liquid phase.
14. Method of claim 13, wherein the bacterial host cell is an *Escherichia coli* cell.
15. Method of claim 14, wherein the *Escherichia coli* cell is an *Escherichia coli* cell of strain BL21 or a derivative strain thereof.
16. Method of any of claims 1-14, wherein said nucleic acid is DNA or RNA.
17. Method of claim 16, wherein said nucleic acid comprises the sequences of SEQ ID NO:11 or SEQ ID NO:12.
18. Method of any of claims 1-17, wherein the nucleic acid is contained in a vector.
19. Method of claim 18, wherein said vector is a prokaryotic expression vector.
20. Method of claim 18 or 19, wherein said vector comprises a T7 promoter.

- 3 -

21. Method of any of claims 18-20, wherein said vector comprises or consists of the sequences of SEQ ID NO:7 or SEQ ID NO:8.
22. Composition obtainable from the method of any of claims 1-21, wherein said composition comprises a protein of 143 amino acids having the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2.
23. Composition of claim 22, wherein said composition comprises less than 1% (w/w) of protein molecules that are shorter than 143 amino acids, as measured by liquid chromatography mass spectrometry (LCMS).
24. Composition of claim 22 or 23, wherein said composition comprises less than 20 pg/mg, preferably less than 15 pg/mg, more preferably less than 10 pg/mg, and most preferably less than 5 pg/mg, less than 3 pg/mg, less than 2 pg/mg or less than 1 pg/mg host cell DNA.
25. Composition of any of claims 22-24, wherein said composition comprises less than 0.2 EU/mg, and preferably less than 0.1 EU/mg or 0.08 EU/mg bacterial endotoxin.
26. Composition of any of claims 22-25, wherein less than 8% (w/w), and preferably less than 7% (w/w), less than 6% (w/w) or less than 5% (w/w), less than 4% (w/w), less than 3% (w/w), or less than 2% (w/w) of the proteins in said composition are carbamoylated.
27. Composition of any of claims 22-26, wherein less than 6% (w/w), and preferably less than 5% (w/w), less than 4% (w/w) or less than 3% (w/w), or less than 2% (w/w) of the proteins in said composition are gluconoylated.
28. Composition of any of claims 22-27, wherein less than 8%, and preferably less than 7%, less than 6% or less than 5% of the MYGDF proteins in the composition of the invention are carbamoylated, wherein the percentage is based on the sum of the peak intensities of unmodified MYDGF protein as well as annotated post-translational modification (PTM) species of MYDGF in a deconvoluted intact mass spectrum of the MYDGF protein in the composition.
29. Composition of any of claims 22-28, wherein less than 6%, and preferably less than 5%, less than 4% or less than 3% of the MYDGF proteins in the composition of the invention are gluconylated, wherein the percentage is based on the sum of the peak intensities of unmodified MYDGF protein as well as annotated post-translational modification (PTM)

- 4 -

species of MYDGF in a deconvoluted intact mass spectrum of the MYDGF protein in the composition.

30. Composition of any of claims 22-29, wherein said composition comprises urea.
31. Composition of any of claims 22-30, wherein said composition comprises a protein of 143 amino acids having the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 and the ratio of the signal for the protein according to SEQ ID NO:1 and the signals for shorter variants in liquid chromatography mass spectrometry (LCMS) after reductive dimethylation (stable isotope dimethyl labelling, SIDL) is at least 50, and preferably more than 100, 200, 300 or 400, wherein only signals from non-carbamoylated and non-gluconoylated proteins are used for calculating said ratio.
32. Composition of any of claims 22-31, wherein said composition comprises a protein of 143 amino acids having the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 and the ratio of the signal for the protein according to SEQ ID NO:2 and the signals for shorter variants in liquid chromatography mass spectrometry (LCMS) after reductive dimethylation (stable isotope dimethyl labelling, SIDL) is at least 50, and preferably more than 75, 100, 150 or 175, wherein only signals from non-carbamoylated and non-gluconoylated proteins are used for calculating said ratio.
33. Composition of any of claims 22-32, wherein said composition comprises a protein which is folded such that more than 70%, and preferably more than 80%, more than 90%, or more than 95%, of the ^1H and/or ^{15}N peaks in the two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy (2D-NMR) map result in combined chemical shift deviation (CCSD) values below 0.01 ppm when compared to the corresponding peaks in Table 1.
34. Composition of any of claims 22-33, wherein said composition comprises the MYDGF protein with a monomer content of more than 95%, 96%, 97%, 98% or 99%.
35. Use of a composition of any of claims 22-34 for the preparation of a pharmaceutical composition.
36. Pharmaceutical composition comprising a composition of any of claims 22-34.
37. Pharmaceutical composition of claim 36, further comprising a pharmaceutically acceptable carrier.

– 5 –

38. Pharmaceutical composition of claim 36 or 37, wherein said composition is formulated for parental administration.
39. Pharmaceutical composition of claim 38, wherein said composition is formulated for intravenous, intraarterial or intracoronary administration.
40. Pharmaceutical composition of claim 39, wherein said composition is formulated for intravenous administration.
41. Composition of any of claims 22-34 or pharmaceutical composition of any of claims 36-40 for use as a medicament.
42. Composition of any of claims 22-34 or pharmaceutical composition of any of claims 36-41 for use in a method of
 - (i) treating or preventing a disease or condition selected from the group consisting of injury, wounding, ischemia, reperfusion injury, trauma, mechanical overload, intoxication, surgery, primary or acquired cardiomyopathy, postischemic contractile dysfunction, myocardial infarction, preferably acute myocardial infarction, angina pectoris, heart failure, inflammation of the heart, heart insufficiency, hypertrophy, and fibrosis;
 - (ii) promoting or improving heart tissue regeneration, cardiomyocyte proliferation, neovascularisation, heart function or left ventricular systolic function after myocardial infarction;
 - (iii) protecting cardiomyocyte from death, e.g. through apoptosis or necrosis; or
 - (iv) decreasing infarct size after myocardial infarction, preferably acute myocardial infarction.
43. Composition of any of claims 22-34 or pharmaceutical composition for use in a method of claim 44 or 45, wherein said cardiomyopathy is inherited cardiomyopathy or cardiomyopathy caused by spontaneous mutations.
44. Composition of any of claims 22-34 or pharmaceutical composition for use in a method of claim 42, wherein said cardiomyopathy is acquired cardiomyopathy, preferably ischemic cardiomyopathy caused by atherosclerotic or other coronary artery diseases, cardiomyopathy caused by infection or intoxication of the myocardium, hypertensive heart

– 6 –

disease caused by pulmonary arterial hypertension and/or arterial hypertension and diseases of the heart valves.

45. Composition of any of claims 22-34 or pharmaceutical composition for use in a method of claim 42, wherein said cardiomyopathy is selected from the group consisting of hypertrophic cardiomyopathy (HCM or HOCM), arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC), isolated ventricular non-compaction mitochondrial myopathy, dilated cardiomyopathy (DCM), restrictive cardiomyopathy (RCM), Takotsubo cardiomyopathy, Loeffler endocarditis, diabetic cardiomyopathy, alcoholic cardiomyopathy, or obesity-associated cardiomyopathy.
46. Composition of any of claims 22-34 or pharmaceutical composition for use in a method of claim 42, wherein said heart failure is chronic heart failure.
47. Composition of any of claims 22-34 or pharmaceutical composition for use in a method of claim 46, wherein said heart failure or chronic heart failure is heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF), heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF), or heart failure with mid-range ejection fraction (HFmrEF).

UEXKÜLL & STOLBERG PartmbB I Calle Beselerstr. 4 I D-22607 Hamburgo

Solicitud electrónica

Oficina Europea de Patentes

80298 Múnich

Número de Solicitud: PCT/EP2023/064899

Solicitante: Boehringer Ingelheim International GmbH

Nuestro No. de Expediente: P115623

2 de abril de 2024

Gu/Gu

Carta que acompaña las modificaciones de conformidad con el Artículo 34 del PCT

Mediante el formulario PCT/IPER/401 adjunto, el solicitante solicita el examen preliminar internacional (Capítulo II del PCT).

El examen se realizará con base en las reivindicaciones modificadas 1-47 aquí presentadas.

Los siguientes comentarios se realizan en respuesta a las objeciones expresadas en el dictamen escrito con fecha del 15 de septiembre de 2023.

1. Modificaciones

1.1 Se realizaron las siguientes modificaciones en consideración a las objeciones planteadas por la Autoridad Internacional de Búsqueda (AIS) en el dictamen escrito:

- En la reivindicación 1, se especificó que la célula huésped es una célula huésped bacteriana. El soporte a la modificación se puede encontrar en la antigua reivindicación 15.
- Se eliminaron las antiguas reivindicaciones 14-15 y 45.
- Se re enumeraron todas las declaraciones restantes cuando fue necesario y se adaptaron sus referencias retrospectivas.

1.2 Es directamente evidente que las modificaciones no introducen materia que vaya más allá de la divulgación de la solicitud presentada. Por consiguiente, se cumplen los requisitos del artículo 34(2)(b) del PCT.

- 1.3 Además, las modificaciones no deben interpretarse como una renuncia a una materia que ya no está cubierta por las reivindicaciones.

2. Novedad - Artículo 33(2) PCT

- 2.1 Con respecto a las reivindicaciones originales 1-50, la AIS consideró que ninguno de los documentos D1- D2 citados anticipa el objeto de estas reivindicaciones. Lo mismo es necesariamente válido para las reivindicaciones modificadas 1- 47 aquí presentadas.
- 2.2 Por lo tanto, el objeto de las nuevas reivindicaciones 1-47 presentadas es novedoso de conformidad con el Artículo 33(2) del PCT.

3. Nivel inventivo - Artículo 33(3) PCT

- 3.1 Se considera que el método objeto de las previas reivindicaciones de método 1-23, que corresponde a las nuevas reivindicaciones 1-21 presentadas es inventivo en vista del estado del arte citado por la AIS.
- 3.2 Por otra parte, se consideró que las previas reivindicaciones 24- 50 carecían de nivel inventivo. La AIS declaró correctamente que el objeto de la reivindicación 1 difiere de la divulgación de D1 en que la proteína MYDGF presenta un residuo adicional de alanina o serina en su extremo N-terminal. Sin embargo, la AIS concluyó incorrectamente en el punto 2.4 del dictamen escrito que no existe ningún efecto técnico vinculado a dicha diferencia.
- 3.3 Aunque la AIS reconoce que una proteína MYDGF que tiene un residuo adicional de alanina o serina en su extremo N-terminal resulta en mayores rendimientos y en una mejor recuperación de los cuerpos de inclusión, se afirma que este efecto no está ligado a la proteína MYDGF en sí, sino que solo se consigue tras la expresión de la proteína en *E. coli*. El solicitante discrepa respetuosamente. De los ejemplos de trabajo de la solicitud presentada se desprende que es la modificación en el extremo N-terminal de la proteína MYDGF la que da lugar a un alto rendimiento y recuperación. Adicionalmente, las proteínas MYDGF modificadas presentan un grado sorprendentemente bajo de modificaciones químicas y postraduccionales en comparación con la proteína MYDGF de tipo salvaje, que consta únicamente de 142 aminoácidos. Al respecto, véanse los cuadros 8 y 12 de la descripción. Por consiguiente, es más que plausible suponer que el efecto técnico descrito en esta solicitud se basa en la proteína modificada como tal.
- 3.4 Sin embargo, incluso suponiendo, en aras de la argumentación, que el efecto técnico solo se consigue al expresar la proteína en una célula huésped bacteriana, la objeción de la AIS sería discutible en vista de las modificaciones introducidas en las reivindicaciones. Cabe señalar que la reivindicación 1 modificada especifica que la expresión se realiza en una célula huésped bacteriana. Por consiguiente, la reivindicación 22 modificada de producto por proceso, en virtud de su referencia a la reivindicación 1, también se refiere a la expresión de proteínas en una célula huésped bacteriana.
- 3.5 De lo anterior se desprende que las previas reivindicaciones 24-50, que corresponden a las reivindicaciones 22-47, se basan en un nivel inventivo, como lo exige el Artículo 33(3) del PCT. Se solicita respetuosamente retirar las objeciones.

4. Claridad - Artículo 6 del PCT

- 4.1 Las nuevas reivindicaciones son claras y concisas y, por lo tanto, cumplen con los requisitos del artículo 6 del PCT.
- 4.2 Como se explicó anteriormente, se modificó la reivindicación 1, especificando que la célula huésped es una célula bacteriana. En consecuencia, se superó la objeción de claridad contenida en el punto 3.1 del dictamen escrito.
- 4.3 La AIS argumentó, además, en relación con la reivindicación 1, que la reivindicación busca definir el asunto para el cual se busca protección mediante un resultado por alcanzar. El solicitante discrepa respetuosamente. Como se indica al final de la página 23 del texto de la solicitud, la maduración se consigue eficazmente mediante aminopeptidasas que se producen en la célula huésped. En consecuencia, no se requieren pasos adicionales en la reivindicación 1 para llegar a la proteína MYDGF madura de 143 aminoácidos. En cambio, la maduración ocurre automáticamente después de la expresión de la proteína.
- 4.4 Finalmente, la objeción del punto 3.4 del dictamen escrito es discutible en vista de la supresión de la reivindicación 45 original.

5. Solicitudes

- 5.1 Se solicita la emisión de un Informe de Examen Preliminar Internacional (IPER) favorable teniendo en cuenta los argumentos y las modificaciones presentadas en el presente documento.
- 5.2 En caso de que se pretenda mantener alguna de las objeciones anteriores, se solicita respetuosamente la emisión de un segundo Dictamen Escrito o una consulta telefónica.

- Firmado electrónicamente –

André Guder
(Asociación No. 1)

Anexos: Nuevas reivindicaciones 1-47 (versión en limpio)
 Nuevas reivindicaciones 1-47 (versión con control de cambios)

NUEVAS REIVINDICACIONES

1. Método para la expresión recombinante de una proteína MYDGF en una célula huésped bacteriana, que comprende
 - (a) proporcionar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína que, tras la maduración, consta de 143 aminoácidos que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2;
 - (b) cultivar la célula huésped en condiciones que permitan la expresión de la proteína;
 - (c) aislar los cuerpos de inclusión que contienen la proteína MYDGF de la célula huésped; y
 - (d) solubilizar los cuerpos de inclusión y volver a plegar la proteína MYDGF.
2. Método de la reivindicación 1, en donde el paso (a) comprende
 - (i) proporcionar una célula huésped que comprenda un ácido nucleico que contenga un marco de lectura abierto, flanqueado por un codón de inicio y un codón de parada, según la secuencia de la SEQ ID NO. 11 o la SEQ ID NO. 12, y preferentemente según la secuencia de la SEQ ID NO. 11, unido de forma operable a un promotor; o
 - (ii) proporcionar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína que, antes de la maduración, consta de 144 aminoácidos que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 15 o SEQ ID NO. 16 y, preferentemente, la secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO. 15.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el paso (a) comprende proporcionar una célula huésped que comprende un ácido nucleico de SEQ ID NO. 7 o SEQ ID NO. 8, y preferentemente un ácido nucleico de SEQ ID NO. 7.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha maduración es la eliminación del residuo de metionina N-terminal.
5. El método de la reivindicación 4, en donde dicha eliminación del residuo de metionina N-terminal se efectúa mediante una o más aminopeptidasas derivadas de células huésped.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende, además, (e) obtener después del paso (d) una proteína MYDGF replegada de 143 aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2 y, preferentemente, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 1.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el replegado de la proteína en el paso (d) comprende la incubación de la proteína en presencia de urea.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicho método comprende, además, (f) purificar la proteína MYDGF.
9. El método de la reivindicación 8, en donde la etapa (f) comprende ultrafiltración, diafiltración, cromatografía de interacción hidrófoba y/o cromatografía de intercambio iónico aniónico.

10. El método de la reivindicación 9, en donde la cromatografía de intercambio aniónico o el paso de cromatografía de interacción hidrofóbica se realiza poniendo en contacto la proteína MYDGF con el material de resina de cromatografía en condiciones que permitan la adsorción de la proteína MYDGF a la resina, lavando opcionalmente la resina y eluyendo la proteína MYDGF de la resina.
11. El método de la reivindicación 10, en donde la adsorción de la proteína MYDGF a la resina de cromatografía de intercambio aniónico se realiza en condiciones de baja fuerza iónica.
12. El método de la reivindicación 11, en donde la adsorción se realiza a una conductividad de menos de 3 mS/cm, menos de 2 mS/cm, menos de 1,5 mS/cm o menos de 1 mS/cm.
13. Cualquier método de cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en donde la desorción de la proteína MYDGF de la resina de intercambio aniónico se efectúa aumentando la concentración de sal y/o disminuyendo el pH de la fase líquida.
14. El método de la reivindicación 13, en donde la célula huésped bacteriana es una célula de *Escherichia coli*.
15. El método de la reivindicación 14, en donde la célula de *Escherichia coli* es una célula de *Escherichia coli* de la cepa BL2 1 o una cepa derivada de la misma.
16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde dicho ácido nucleico es ADN o ARN.
17. El método de la reivindicación 16, en donde dicho ácido nucleico comprende las secuencias de SEQ ID NO. 11 o SEQ ID NO. 12.
18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde el ácido nucleico está contenido en un vector.
19. El método de la reivindicación 18, en donde dicho vector es un vector de expresión procariota.
20. El método de la reivindicación 18 o 19, en donde dicho vector comprende un promotor T7.
21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18-20, en donde dicho vector comprende o consiste en las secuencias de SEQ ID NO. 7 o SEQ ID NO. 8.
22. La composición obtenible a partir del método de cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en donde dicha composición comprende una proteína de 143 aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2.
23. La composición de la reivindicación 22, en donde dicha composición comprende menos del 1 % (p/p) de moléculas de proteína que son más cortas que 143 aminoácidos, medidos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LCMS).
24. La composición de la reivindicación 22 o 23, en donde dicha composición comprende menos de 20 pg/mg, preferiblemente menos de 15 pg/mg, más preferiblemente menos de 10 pg/mg, y más preferiblemente menos de 5 pg/mg, menos de 3 pg/mg, menos de 2 pg/mg o menos de 1 pg/mg de ADN de célula huésped.
25. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 22-24, en donde dicha composición comprende menos de 0,2 UE/mg, y preferiblemente menos de 0,1 UE/mg o 0,08 UE/mg de endotoxina bacteriana.

26. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 22-25, en donde menos del 8 % (p/p), y preferiblemente menos del 7 % (p/p), menos del 6 % (p/p) o menos del 5 % (p/p), menos del 4 % (p/p), menos del 3 % (p/p) o menos del 2 % (p/p) de las proteínas en dicha composición están carbamoiladas.
27. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 22-26, en donde menos del 6 % (p/p), y preferiblemente menos del 5 % (p/p), menos del 4 % (p/p) o menos del 3 % (p/p), o menos del 2 % (p/p) de las proteínas de dicha composición están gluconoiladas.
28. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 22-27, en donde menos del 8 %, y preferiblemente menos del 7 %, menos del 6 % o menos del 5 % de las proteínas MYDGF en la composición de la invención están carbamoiladas, en donde el porcentaje se basa en la suma de las intensidades de pico de la proteína MYDGF no modificada así como de las especies de modificación postraducciona (PTM) anotadas de MYDGF en un espectro de masas intacto deconvolucionado de la proteína MYDGF en la composición.
29. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 22-28, en donde menos del 6 %, y preferiblemente menos del 5 %, menos del 4 % o menos del 3 % de las proteínas MYDGF en la composición de la invención están gluconiladas, en donde el porcentaje se basa en la suma de las intensidades de pico de la proteína MYDGF no modificada así como las especies de modificación postraducciona (PTM) anotadas de MYDGF en un espectro de masas intacto deconvolucionado de la proteína MYDGF en la composición.
30. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 22-29, en donde dicha composición comprende urea.
31. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 22-30, en donde dicha composición comprende una proteína de 143 aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 1 y la relación de la señal para la proteína según SEQ ID NO. 1 y las señales para variantes más cortas en cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LCMS) tras dimetilación reductora (marcaje isotópico estable con dimetilo, SIDL) es de al menos 50, y preferiblemente más de 100, 200, 300 o 400, en las que solo se utilizan señales de proteínas no carbamoiladas y no gluconoiladas para calcular dicha relación.
32. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 22-31, en donde dicha composición comprende una proteína de 143 aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 2 y la relación de la señal para la proteína según SEQ ID NO. 2 y las señales para variantes más cortas en cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LCMS) tras dimetilación reductora (marcaje isotópico estable con dimetilo, SIDL) es de al menos 50, y preferiblemente más de 75, 100, 150 o 175, en las que solo se utilizan señales de proteínas no carbamoiladas y no gluconoiladas para calcular dicha relación.
33. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 22-32, en donde dicha composición comprende una proteína que está plegada de tal manera que más del 70 %, y preferiblemente más del 80 %, más del 90 % o más del 95 %, de los picos ^1H y/o ^{15}N en el mapa de espectroscopia de resonancia magnética nuclear bidimensional (2D-NMR) dan como resultado valores de desviación de desplazamiento químico combinado (CCSD) inferiores a 0,01 ppm en comparación con los picos correspondientes en la Tabla 1.

34. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 22-33, en donde dicha composición comprende la proteína MYDGF con un contenido de monómero de más del 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %.
35. Uso de una composición de cualquiera de las reivindicaciones 22-34 para la preparación de una composición farmacéutica.
36. Composición farmacéutica que comprende una composición de cualquiera de las reivindicaciones 22-34.
37. La composición farmacéutica de la reivindicación 36, que comprende, además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
38. La composición farmacéutica de la reivindicación 36 o 37, en donde dicha composición está formulada para administración parenteral.
39. La composición farmacéutica de la reivindicación 38, en donde dicha composición está formulada para administración intravenosa, intraarterial o intracoronaria.
40. La composición farmacéutica de la reivindicación 39, en donde dicha composición está formulada para administración intravenosa.
41. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 22-34 o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 36-40 para su uso como medicamento.
42. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 22-34 o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 36-41 para su uso en un método para
 - (i) tratar o prevenir una enfermedad o afección seleccionada del grupo que consiste en lesión, herida, isquemia, lesión por reperfusión, traumatismo, sobrecarga mecánica, intoxicación, cirugía, miocardiopatía primaria o adquirida, disfunción contráctil postisquémica, infarto de miocardio, preferiblemente infarto agudo de miocardio, angina de pecho, insuficiencia cardíaca, inflamación del corazón, insuficiencia cardíaca, hipertrofia y fibrosis;
 - (ii) promover o mejorar la regeneración del tejido cardíaco, la proliferación de cardiomiocitos, la neovascularización, la función cardíaca o la función sistólica del ventrículo izquierdo tras un infarto de miocardio;
 - (iii) proteger al cardiomiocito de la muerte, por ejemplo, por apoptosis o necrosis; o
 - (iv) disminuir el tamaño del infarto tras un infarto de miocardio, preferentemente un infarto agudo de miocardio.
43. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 22-34 o composición farmacéutica para su uso en un método de la reivindicación 44 o 45, en donde dicha miocardiopatía es miocardiopatía hereditaria o miocardiopatía causada por mutaciones espontáneas.
44. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 22-34 o composición farmacéutica para su uso en un método de la reivindicación 42, en donde dicha miocardiopatía es miocardiopatía adquirida, preferiblemente es miocardiopatía química causada por enfermedades ateroscleróticas u otras enfermedades de las arterias coronarias, miocardiopatía causada por infección o

intoxicación del miocardio, enfermedad cardíaca hipertensiva causada por hipertensión arterial pulmonar y/o hipertensión arterial y enfermedades de las válvulas cardíacas.

45. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 22-34 o composición farmacéutica para su uso en un método de la reivindicación 42, en donde dicha miocardiopatía se selecciona del grupo que consiste en miocardiopatía hipertrófica (HCM o HOCM), miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho (ARVC), miopatía mitocondrial no compactada ventricular aislada, miocardiopatía dilatada (DCM), miocardiopatía restrictiva (RCM), miocardiopatía de Takotsubo, endocarditis de Loeffler, miocardiopatía diabética, miocardiopatía alcohólica o miocardiopatía asociada a la obesidad.
46. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 22-34 o composición farmacéutica para su uso en un método de la reivindicación 42, en donde dicha insuficiencia cardíaca es insuficiencia cardíaca crónica.
47. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 22-34 o composición farmacéutica para su uso en un método de la reivindicación 46, en donde dicha insuficiencia cardíaca o insuficiencia cardíaca crónica es insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada (HFpEF), insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida (HFrEF) o insuficiencia cardíaca con fracción de eyección de rango medio (HFmrEF).