



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ :C12N 15/60, 15/62, 9/88, C12P 21/02,
C07K 16/40, A61K 48/00, A61P 9/10

A3

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 00/09711**(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:

24. Februar 2000 (24.02.00)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/02601

(22) Internationales Anmeldedatum: 16. August 1999 (16.08.99)

(30) Prioritätsdaten:

198 37 015.6

14. August 1998 (14.08.98)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): VA-
SOPHARM BIOTECH GMBH & CO. KG [DE/DE];
Sedanstrasse 27, D-97082 Würzburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHMIDT, Harald [DE/DE];
Langes Gräthlein 26, D-97078 Würzburg (DE). ZABEL,
Ulrike [DE/DE]; Am Seelein 26, D-97228 Rottendorf (DE).
POLLER, Wolfgang [DE/DE]; Nipkowstrasse 16, D-12489
Berlin (DE).(74) Anwälte: VOSSIUS, Volker usw.; Holbeinstrasse 5, D-81679
München (DE).(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB,
GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW,
ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG,
ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI
Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe-
richts:

15. Juni 2000 (15.06.00)

(54) Title: ISOLATED AND PURIFIED HUMAN SOLUBLE GUANYLYLCYCLASE $\alpha 1/\beta 1$ (hsGC $\alpha 1/\beta 1$)(54) Bezeichnung: ISOLIERTE UND GEREINIGTE HUMANE LÖSLICHE GUANYLYLCYCLASE $\alpha 1/\beta 1$ (hsGC $\alpha 1/\beta 1$)

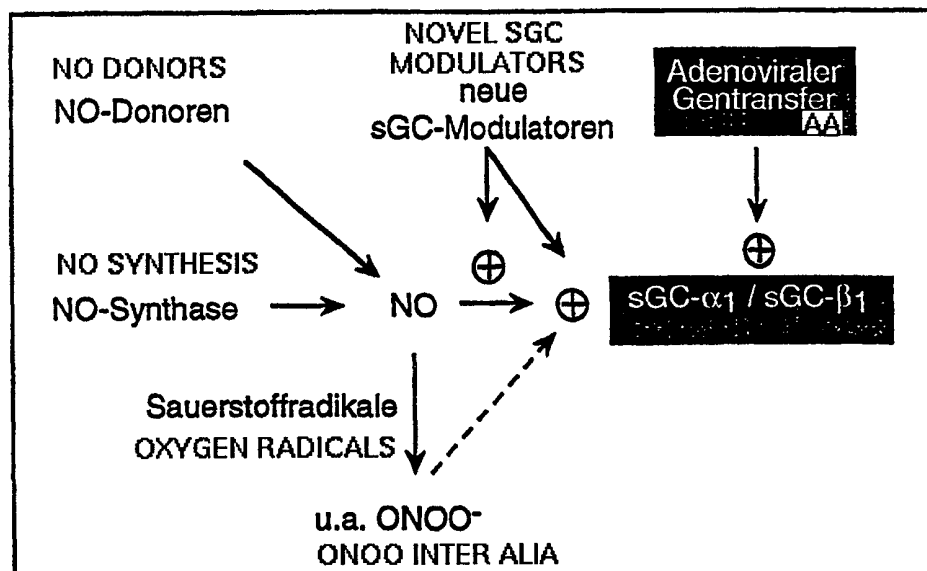
(57) Abstract

The invention relates to the expression of the cDNA clone for sub-units $\alpha 1$ (hsGC $\alpha 1$) and $\beta 1$ (hsGC $\beta 1$) of human soluble guanylylcyclase and the subsequent purification of the active enzyme and use thereof, the medical application of the expression of this clone by gene transfer, in addition to antibodies against peptides derived from said sequence and the use thereof.

(57) Zusammenfassung

Beschrieben ist die Expression der cDNA-Klone für die Untereinheiten $\alpha 1$ (hsGC $\alpha 1$) und $\beta 1$ (hsGC $\beta 1$) der humanen

löslichen Guanylylcyclase und die nachfolgende Aufreinigung des aktiven Enzyms und dessen Anwendung, die medizinische Anwendung der Expression dieser Klone durch Gentransfer, sowie Antikörper gegen aus der Sequenz abgeleitete Peptide und deren Anwendung.



AA...ADENOVIRAL GENE TRANSFER

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

International Application No
PCT/DE 99/02601

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7	C12N15/60	C12N15/62	C12N9/88	C12P21/02	C07K16/40
	A61K48/00	A61P9/10			

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by
IPC 7 C12N C12P C07K A61K A61P

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)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BEHRENDT ET AL.: "A variant of the alpha 2 subunit of soluble guanylyl cyclase contains an insert homologous to a region within adenylyl cyclases and functions as a dominant negative protein" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 36, 8 September 1995 (1995-09-08), pages 21109-21113, XP002132769 page 21109 -page 21111; figure 3; table 1	1-13, 15
X	GANSEMAN ET AL.: "Human soluble guanylate cyclase large subunit mRNA, alpha3-like" EMBL DATABASE ACC NO: U58855, 9 January 1998 (1998-01-09), XP002132770 abstract	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 March 2000

Date of mailing of the International search report

03/04/2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

van Klompenburg, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No.

PCT/DE 99/02601

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GIULI ET AL.: "Molecular cloning of the cDNAs coding for the two subunits of soluble guanylyl cyclase from human brain" FEBS LETTERS, vol. 304, June 1992 (1992-06), pages 83-88, XP002132771 cited in the application figures 1,2,4	1-13
X	GUPTA ET AL.: "Expression and purification of soluble, active heterodimeric guanylyl cyclase from baculovirus" PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, vol. 10, no. 3, August 1997 (1997-08), pages 325-330, XP000877369 page 325 -page 328; figures 3-5; table 1	1-13
A	OLSON ET AL.: "Selective guanylyl cyclase inhibitor reverses nitric oxide-induced vasorelaxation" HYPERTENSION, vol. 29, 1997, pages 254-261, XP002132772 page 255; figures 1,2	9-12
P,X	ZABEL ET AL.: "Human soluble guanylate cyclase: functional expression and revised isoenzyme family" BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 335, October 1998 (1998-10), pages 51-57, XP002132773 figures 1-3,5	1-8, 13-15
P,X	ZABEL ET AL.: "Homodimerization of soluble guanylyl cyclase subunits" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 26, 25 June 1999 (1999-06-25), pages 18149-18152, XP002132774 page 18150, column 2 -page 18152; figures 1-3	1-8, 13-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE99/02601

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:

Observation : Although Claims Nos. 9-12 relate to a method of treatment for the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited 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:

see annexe

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.

The International Searching Authority found that this international application contains multiple inventions, as follows :

1. Claims Nos. 1-8

Isolated and purified human soluble guanylylclase alphas/betas for apparent homogeneity. A method for the production of human soluble guanylylclase alphas/betas and a method for the production of the sub-unit alpha and/or beta of human soluble guanylylclase alphas/betas.

2. Claims Nos. 9-12

Use of a nucleic acid sequence that codes for the sub-unit alpha and/or beta of human soluble guanylylclase alphas/betas for somatic gene therapy.

3. Claims Nos. 13-15

Antibodies against human soluble guanylylclase alphas/betas that can be obtained by immunization of a mammal with hGCalpha/beta of sub-unit alpha or beta or immunogenic peptide fragments thereof and isolation of the antibodies.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aldenzeichen

PCT/DE 99/02601

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/60 C12N15/62 C12N9/88 C12P21/02 C07K16/40
A61K48/00 A61P9/10

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)

IPK 7 C12N C12P C07K A61K A61P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BEHRENDT ET AL.: "A variant of the alpha 2 subunit of soluble guanylyl cyclase contains an insert homologous to a region within adenylyl cyclases and functions as a dominant negative protein" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 270, Nr. 36, 8. September 1995 (1995-09-08), Seiten 21109-21113, XP002132769 Seite 21109 -Seite 21111; Abbildung 3; Tabelle 1	1-13, 15
X	GANSEMANS ET AL.: "Human soluble guanylate cyclase large subunit mRNA, alpha3-like" EMBL DATABASE ACC NO: U58855, 9. Januar 1998 (1998-01-09), XP002132770 Zusammenfassung	1-13
	-/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld 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" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere 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

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. März 2000

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

03/04/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

van Klompenburg, W

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GIULI ET AL.: "Molecular cloning of the cDNAs coding for the two subunits of soluble guanylyl cyclase from human brain" FEBS LETTERS, Bd. 304, Juni 1992 (1992-06), Seiten 83-88, XP002132771 in der Anmeldung erwähnt Abbildungen 1,2,4	1-13
X	GUPTA ET AL.: "Expression and purification of soluble, active heterodimeric guanylyl cyclase from baculovirus" PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, Bd. 10, Nr. 3, August 1997 (1997-08), Seiten 325-330, XP000877369 Seite 325 -Seite 328; Abbildungen 3-5; Tabelle 1	1-13
A	OLSON ET AL.: "Selective guanylyl cyclase inhibitor reverses nitric oxide-induced vasorelaxation" HYPERTENSION, Bd. 29, 1997, Seiten 254-261, XP002132772 Seite 255; Abbildungen 1,2	9-12
P,X	ZABEL ET AL.: "Human soluble guanylate cyclase: functional expression and revised isoenzyme family" BIOCHEMICAL JOURNAL, Bd. 335, Oktober 1998 (1998-10), Seiten 51-57, XP002132773 Abbildungen 1-3,5	1-8, 13-15
P,X	ZABEL ET AL.: "Homodimerization of soluble guanylyl cyclase subunits" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 274, Nr. 26, 25. Juni 1999 (1999-06-25), Seiten 18149-18152, XP002132774 Seite 18150, Spalte 2 -Seite 18152; Abbildungen 1-3	1-8, 13-15

Feld I 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
Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 9-12 sich 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 sinnvolle 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 II 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:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren 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 konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren 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 Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐

Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN**PCT/ISA/ 210**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-8

Isolierte und zur apparenten Homogenität gereinigte humane lösliche guanylylcyclase alpha1/beta1. Ein Verfahren zur Herstellung der humanen löslichen guanylylcyclase alpha1/beta1 und ein Verfahren zur Herstellung der Untereinheit alpha1 und/oder beta1 der humanen löslichen Guanylylcyclase

2. Ansprüche: 9-12

Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die die Untereinheit alpha1 und/oder beta1 der humanen löslichen guanylylcyclase alpha1/beta1 kodiert, für die Somatische Gentherapie

3. Ansprüche: 13-15

Antikörper gegen humane lösliche Guanylylcyclase alpha1/beta1 erhältlich durch Immunisieren eines Säugers mit hsGCalpha1/beta1, der Untereinheit alpha1 oder beta1 oder immunogenen Peptidfragmenten davon und Isolieren der Antikörper.