

Clarke, M

COI

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-109382- -00003-0000

Fecha: 2014-03-11 15:41:24
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 523 RESPUESTA

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 379 FASENACIONALII
Folios: 48

P-3735

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. 13.109382

Solicitud de patente a nombre de **CATALYST BIOSCIENCES, INC**

Yo, SILVANA MARIA LOPEZ DIAZ identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, piso 6, obrando como apoderada sustituta de acuerdo con la sustitución presentada el 15 de enero de 2014 de la sociedad **CATALYST BIOSCIENCES, INC**, solicitante de la patente de la referencia domiciliada en California, Estados Unidos de América, en respuesta al oficio No. 19879 notificado por fijación en lista el 29 de octubre de 2013, relacionado con concepto técnico de fondo, me permito manifestar:

1. Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto con este memorial nuevo capítulo reivindicatorio el cual reemplaza aquel originalmente presentado.

La reivindicación 1 ha sido modificada para recitar que las posibles sustituciones en los polipéptidos FVII de las SEQ ID NOS: 1-3 y 18-74. La reivindicación 1 incorpora las limitaciones de la reivindicación anterior 8 para mencionar las sustituciones particulares. LA persona versada en la materia puede identificar cada polipéptido dentro del alcance de las reivindicaciones mediante llevar a cabo las sustituciones de aminoácidos mencionadas en las nuevas reivindicaciones en los polipéptidos de las SEQ ID NOS: 1-3 y 18-74.

En cuanto a estas modificaciones, me permito decir que las mismas no amplían de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud y se realizaron con el ánimo de superar las objeciones de claridad y nivel inventivo planteadas por el examinador en su concepto técnico.

En relación con las reivindicaciones adjuntas modificadas, nos permitimos decir que no se paga tasa adicional dado que el nuevo pliego reivindicatorio tiene tan solo 14 cláusulas en comparación con las 333 originalmente presentadas y por las cuales se presentó tasa en su debido momento.

P-3735

1148

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

2. Claridad de la solicitud

Respecto a este punto, el solicitante manifiesta que mediante las modificaciones realizadas en el capítulo reivindicatorio quedan subsanadas la totalidad de las objeciones.

En cuanto al título, nos permitimos decir que el mismo se modifica y queda del siguiente tenor: "POLIPEPTIDOS DEL FACTOR VII QUE SE MODIFICAN"

Se dice que la reivindicación 1 no es clara porque no indica que mutaciones adicionales están incluidas en los polipéptidos FVII. La reivindicación 1 nueva que presento menciona las mutaciones establecidas en la reivindicación 8, y por lo tanto ahora menciona las mutaciones adicionales que pueden ser incluidas. La reivindicación 1 identifica el polipéptido FVII no modificado en el cual se introducen los remplazos de aminoácidos. Así, las secuencias de todos los polipéptidos reivindicados se conocen. Las SEQ ID NOS: 1 y 2 dan la secuencia de los polipéptidos FVII precursores humanos; La SEQ ID NO: 3 da la secuencia de la forma madura de las SEQ ID NOS: 1 y 2; Las SEQ ID NOS: 18 – 74 establecen las secuencias de otras especies y variantes conocidas de FVII.

La solicitud suministra más de 200 mutantes y mostró que las mutaciones Q286R incrementan de manera consistente la actividad de los polipéptidos FVII. La modificación de la reivindicación 1 muestra los remplazos particulares de aminoácidos.

FVII es bien conocido, mientras que las propiedades de los mutantes con las mutaciones 286R/298Q no habían sido enseñadas o sugeridas previamente, hay un conocimiento extenso con referencia a su estructura y función. Los efectos de la mutación de más de 220 de los residuos de aminoácidos se reportan en el arte previo. Además, la presente solicitud suministra más de 300 mutantes, incluyendo muchos (como se muestra, por ejemplo, en las tablas reproducidas arriba) que contienen las mutaciones 286R/298Q en combinación con numerosas otras mutaciones. Fragmentos del polipéptido FVII, tales como el polipéptido FVIIa y otras formas activadas se pueden preparar y/o identificar fácilmente.

En vista de 1) el conocimiento extensivo en la técnica con respecto a los requisitos para la actividad coagulante de polipéptidos FVII; 2) la divulgación en el arte previo de los efectos de la mutación de muchos de los residuos y el conocimiento de la estructura y función de FVII; 3) la ejemplificación y provisión en la solicitud de muchos polipéptidos de Factor VII (FVII) modificados, incluyendo polipéptidos FVII con remplazos de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 286 con Arg (R); y 4) suministrar numerosos ejemplos de trabajo de polipéptidos FVII modificados, incluyendo mostrar muchos de los polipéptidos que contienen las mutaciones 286R solas, al igual que mutaciones adicionales, y retener la actividad catalítica y exhibir actividad catalítica incrementada, la solicitud suministra soporte para cualquier polipéptido FVII que comprenda mutaciones correspondientes a 286R sola o en combinación con hasta 6 otras mutaciones fue conocido.

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

La correlación entre la estructura y función de una multitud de modificaciones de aminoácidos en FVII eran conocidas y descritas en la técnica con anterioridad a la fecha de la prioridad más temprana reivindicada de esta solicitud. Más aún, las variantes del polipéptido FVII, incluyendo las variantes y mutantes alélicas y de especies, eran bien conocidas al momento de la fecha más temprana de prioridad de esta solicitud y se suministran en la solicitud; numerosas de tales mutaciones y mutantes se describen en la solicitud. Los remplazos de aminoácidos con Arg(R) en las posiciones correspondientes a la posición 286, introducidos dentro de cualquiera de los muchos polipéptidos conocidos por aquellos versados en la técnica y/o están incluidos en los muchos polipéptidos descritos en la solicitud. La descripción detallada en la solicitud a la luz del conocimiento de aquellos versados en la técnica muestra que la persona versada en la técnica puede preparar cualquier polipéptido FVII e incluir la mutación Arg(R). La contribución de la Solicitante a la técnica incluye el descubrimiento de que la introducción de estas mutaciones en 286R incrementa la actividad coagulante del FVII. Aquellos versados en la técnica armados con el conocimiento y la extensiva ejemplificación en la solicitud pueden preparar con facilidad polipéptidos FVII con estas mutaciones y mutaciones adicionales.

1. Las enseñanzas en la Memoria descriptiva

2.

a) Polipéptidos FVII modificados

La solicitud describe ejemplos de trabajo de más de **200 polipéptidos FVII modificados** que exhiben actividad, incluyendo ejemplos de trabajo de polipéptidos FVII modificados. La especificación describe modificaciones en la posición 286 con referencia a un polipéptido FVII que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:3, y establece que el polipéptido FVII resultante que contiene la modificación puede ser de cualquier forma del mismo, tal como una forma precursora, una forma de cadena única, una forma de dos cadenas, una forma zimógena o una forma madura activada; y variantes de especies no humanas:

Como se usan en la presente, Factor VII (FVII, F7; también referido como como Factor 7, factor VII de coagulación, factor VII de suero, acelerador de la conversión de protrombina en suero, SPCA, proconvertina y eptacog alfa) se refiere a una serina proteasa que es parte de la cascada de coagulación. FVII incluye un dominio Gla, dos dominios EGF (EGF-1 y EGF-2), y un dominio de serina proteasa (o dominio de peptidasa S1) que está altamente conservado entre todos los miembros de la familia de la peptidasa S1 de serina proteasas, tal como por ejemplo con quimiotripsina. La secuencia de un **precursor ejemplar FVII que tiene un péptido de señal y propéptido está establecida en SEQ ID NO: 1. Un polipéptido maduro FVII ejemplar está establecido en SEQ ID NO:3.** FVII se presenta como un **zimógeno de cadena sencilla, un polipéptido de dos cadenas tipo zimógeno y una forma completamente activada de dos cadenas.** La activación complete, que se presenta con el cambio conformacional de una forma tipo zimógeno, sucede con el enlace a su factor de tejido de co-factor. También, se pueden introducir mutaciones que resulten en el cambio de conformación en la ausencia del factor de tejidos. Así, **la referencia a FVII incluye formas de cadena sencilla y de dos cadenas del mismo, incluyendo formas de tipo zimógeno y de dos cadenas completamente activadas.**

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

La referencia al polipéptido FVII también incluye **polipéptidos precursores** y polipéptidos maduros FVII en formas de cadena sencilla o dos cadenas, formas truncadas de los mismos que tienen actividad, e incluye variantes alélicas y variantes de especies, variantes codificadas por variantes de empalme, y otras variantes, incluyendo polipéptidos que tienen al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad de secuencias al polipéptido precursor establecido en SEQ ID NO: 1 o la forma madura del mismo. Se incluyen polipéptidos FVII modificados, tal como aquellos de SEQ ID NOS: 113 y 273 y variantes de los mismos. [Página 22, línea 28 a página 23, línea 16]

Los polipéptidos FVII también incluyen aquellas que contienen modificaciones químicas o post-transduccionales y aquellas que no contienen modificaciones químicas o post-traduccionales. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, pegilación, albuminación, glicosilación, farnesilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación, y otras modificaciones de polipéptidos conocidas en la técnica. [página 23, líneas 25-32]

La solicitud describe formas de precursor y formas maduras de polipéptidos FVII y cómo identificar residuos correspondientes entre estas formas:

Alguien experto en la técnica reconoce que las posiciones referidas del polipéptido maduro del factor VII (SEQ ID NO:3) difiere por 60 residuos de aminoácidos cuando en comparación con la isoforma un polipéptido precursor FVII establecido en SEQ ID NO: 1, que es la isoforma de un polipéptido del factor VII que contiene las secuencias del péptido de señal y propéptidos. Así, el primer residuo de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 "corresponde a" el sexagésimo primer (61°) residuo de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Alguien experto en la técnica también reconoce que las posiciones referidas del polipéptido maduro del factor VII (SEQ ID NO: 3) difiere por 38 residuos de aminoácidos cuando en comparación con el polipéptido precursor FVII establecido en SEQ ID NO:2, que es el polipéptido de factor VII de la isoforma b que contiene las secuencias del péptido de señal y de propéptidos. Así, el primer residuo de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 "corresponde a" el trigésimo noveno (39°) residuo de aminoácidos de SEQ ID NO:2. [Página 24, líneas 14-25] de la correspondiente solicitud internacional.

La especificación describe los polipéptidos FVII modificados de diferentes especies:

Los polipéptidos FVII ejemplares son aquellos de origen mamífero, incluyendo humanos. Las secuencias de aminoácidos ejemplares de FVII de origen humano están establecidas en SEQ ID NOS: 1, 2, y 3. Las variantes ejemplares de tal FVII polipéptido humano, que incluye cualquiera de los polipéptidos precursores establecidos en SEQ ID NOS:18-74. Los polipéptidos FVII también incluyen cualquiera de origen no humano incluyendo, pero no limitado a, murino, canino, felino, leporino, aviar, bovino, ovino, porcino, equino, piscino, ranino, y otros polipéptidos de factor VII del primate. Los polipéptidos FVII ejemplares de origen no humano incluyen, por ejemplo, vaca (*Bos taurus*, SEQ ID NO:4), ratón (*Mus musculus*, SEQ ID NO:5), chimpancé pigmeo (*Pan paniscus*, SEQ ID NO:6), chimpancé (*Pan troglodytes*,

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

SEQ ID NO:7), conejo (*Oryctolagus cuniculus*, SEQ ID NO:8), rat (*Rattus norvegicus*, SEQ ID NO: 9), mono rhesus (*Macaca mulatto*, SEQ ID NO: 10), cerdo (*Sus scrofa*, SEQ ID NO:11), dog (*Canis familiaris*, SEQ ID NO: 12), pez cebra (*Brachydanio rerio*, SEQ ID NO: 13), pez globo japonés (*Fugu rubripes*, SEQ ID NO: 14), pollo (*Gallus gallus*, SEQ ID NO: 15), orangután (*Pongo pygmaeus*, SEQ ID NO: 16) y gorila (*Gorilla gorilla*, SEQ ID NO: 17). [página 23, línea 33 a página 24, línea 13] de la correspondiente solicitud internacional.

La solicitud describe que los polipéptidos FVII modificados pueden exhibir actividad procoagulante, y describe isoformas específicas a tejido, variantes alélicas, moléculas sintéticas, formas quiméricas y modificadas de polipéptidos FVII:

También se incluyen aquellos que conservan al menos una actividad de un FVII, tal como enlace a TF, enlace a factor X, enlace a fosfolípidos, y/o actividad coagulante de un FVII. Al retener la actividad, la actividad puede ser alterada, tal como reducida o incrementada, en comparación con un FVII de tipo silvestre con tal de que el nivel de actividad retenido sea suficiente para producir un efecto detectable. Los polipéptidos FVII incluyen, pero no se limitan a, isoformas específicas de tejidos y variantes alélicas de los mismos, moléculas sintéticas preparadas por la traducción de ácidos nucleicos, proteínas generadas por síntesis química, tales como síntesis que incluyen ligamiento de polipéptidos más cortos, a través de métodos recombinantes, proteínas aisladas de tejido y células humanas y no humanas, polipéptidos quiméricos FVII y formas modificadas de los mismos. Los polipéptidos FVII también incluyen fragmentos o porciones de FVII que tienen una longitud suficiente o que incluyen regiones apropiadas para retener al menos una actividad (con activación si es necesario) de un polipéptido maduro de longitud completa. [página 23, líneas 16-28] de la correspondiente solicitud internacional.

La secuencia y estructura de formas múltiples diferentes, y especies variantes y alélicas del FVII son conocidas para la persona versada en la materia, y ejemplos de estas se describen en la especificación (ver, por ejemplo, SEQ ID NOS: 4-17 y 44-100). Por ejemplo, la especificación provee la secuencia de varias especies variantes (ver, por ejemplo, vaca (*Bos taurus*, SEQ ID NO:4), ratón (*Mus musculus*, SEQ ID NO:5), chimpancé pigmeo (*Pan paniscus*, SEQ ID NO:6), chimpancé (*Pan troglodytes*, SEQ ID NO:7), conejo (*Oryctolagus cuniculus*, SEQ ID NO:8), rat (*Rattus norvegicus*, SEQ ID NO: 9), mono rhesus (*Macaca mulatto*, SEQ ID NO: 10), cerdo (*Sus scrofa*, SEQ ID NO:11), dog (*Canis familiaris*, SEQ ID NO: 12), pez cebra (*Brachydanio rerio*, SEQ ID NO: 13), pez globo japonés (*Fugu rubripes*, SEQ ID NO: 14), pollo (*Gallus gallus*, SEQ ID NO: 15), orangután (*Pongo pygmaeus*, SEQ ID NO: 16) y gorila (*Gorilla gorilla*, SEQ ID NO: 17) y variantes alélicas (ver por ejemplo SEQ ID NOS: 44-100 y sus formas maduras).

La solicitud en su especificación describe además modificaciones de aminoácidos que pueden ser incluidas. Entre las modificaciones descritas en la especificación están aquellas que conservan la actividad procoagulante FVII. La especificación enseña y demuestra numerosas mutaciones y los efectos de estas sobre la actividad. La especificación detalla cómo modificar el FVII, y cómo medir la actividad procoagulante de los polipéptidos FVII modificados. La especificación ejemplifica los polipéptidos

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

FVII modificados con numerosos ejemplos, incluyendo polipéptidos FVII modificados que conservan la actividad procoagulante. Como se discutió antes, el ejemplo 4, las Tablas 14 y 15, reproducidas antes, describen los resultados de los ensayos indirecto dependiente de TF y los ensayos indirectos independientes de TF que miden la actividad catalítica de los polipéptidos FVII modificados que incluyen modificaciones de aminoácidos únicos, dobles y múltiples. Se suministran muchas mutaciones contienen las mutaciones 286R.

Ejemplos de trabajo que suministran los polipéptidos FVII modificados que exhiben actividad procoagulante se incluyen en la solicitud (ver, por ejemplo, Ejemplos 6 y 13 lo mismo que el EJEMPLO 4). Combinar las mutaciones como se reivindicó con mutaciones adicionales también se ejemplifica. Por ejemplo, el Ejemplo 6 muestra que un polipéptido FVII modificado con las modificaciones de aminoácidos **Q286R**, conservan la actividad catalítica solos o cuando se combinan con modificaciones adicionales tal como Gla Swap FIX, Gla SwapFIX/K43I, S222A/H257A, Q366N, Gla Swap FIX/K43I/Q366N/, H373F, T239V, T239V/H373F, T239I/H373F and Q366N/H373F. El Ejemplo 6 también describe polipéptidos FVII modificados 81, 51 y 17 que incluyen al menos 1, al menos 2, y al menos 3 remplazos, respectivamente, seleccionados entre remplazos con Asn (N) en la posición 128, remplazo con Ala (A) en la posición 129, remplazo con Arg (R) en la posición 286 y remplazo con Gln (Q) en la posición 298, son activos.

Ejemplo 13, iniciando en la página 269, describe las mediciones de la actividad sobre sustrato tripéptido ACC Mesyl-dFPR-ACC de más de **120** polipéptidos FVII modificados. **Todos los polipéptidos FVII modificados ensayados exhiben actividad.**

b) Posiciones “correspondientes” a un polipéptido FVII

La especificación describe en detalle, incluyendo ejemplos, los métodos para identificar residuos correspondientes entre los polipéptidos FVII modificados:

Como se usa en este documento, residuos correspondientes se refieren a residuos que se presentan en los lugares alineados. Los polipéptidos relacionados o variantes se alinean por cualquier método conocido por aquellos expertos en la técnica. Tales métodos típicamente maximizan las coincidencias, e incluyen métodos tales como el uso de alineaciones manuales y el uso de diversos programas de alineación disponibles (por ejemplo, BLASTP) y otros conocidos por aquellos expertos en la técnica. Al alinear las secuencias de polipéptidos, alguien experto en la técnica puede identificar los residuos correspondientes, al usar residuos de aminoácidos conservados e idénticos como guías. Por ejemplo, al alinear las secuencias de los polipéptidos del factor VII, alguien experto en la técnica puede identificar residuos correspondientes, usando residuos de aminoácidos conservados e idénticos como guías. Por ejemplo, la alanina en la posición de aminoácido 1 (A1) de SEQ ID NO:3 (factor VII maduro) corresponde a la alanina en la posición de aminoácido 61 (A61) de SEQ ID NO:1, y la alanina en la posición de aminoácido 39 (A39) de SEQ ID NO:2. En otros casos, pueden identificarse las regiones que corresponden. Por ejemplo, el dominio Gla corresponde a las posiciones de aminoácidos A1 a F45 de la SEQ ID NO:3, a las posiciones de aminoácidos A61 a S105 de la SEQ ID NO:1 y a las posiciones de aminoácidos A39 a S83 de la SEQ ID NO:2. Una persona versada en la técnica puede también emplear

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

residuos de aminoácidos conservados como guías para encontrar residuos de aminoácidos entre y en secuencias humanas y no humanas. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos S43 y E163 de la SEQ ID NO:3 (humana) corresponden a S83 y E203 de la SEQ ID NO:4 (bovina). Las posiciones correspondientes también pueden basarse en alineaciones estructurales, por ejemplo mediante usar alineaciones de la estructura de proteínas simuladas por computadora. [página 24, línea 26 a página 25, línea 13] de la correspondiente solicitud internacional.

Como se ve, la solicitud suministra las numerosas variantes FVII, incluyendo variantes de especies y variantes alélicas, y describe, cómo, si es necesario, identificar las posiciones 128, 129, 286 y 298 en un polipéptido FVII, incluyendo varias variantes alélicas y de especies de FVII, evidenciando la posesión de un gran número de variantes FVII que incluyen las mutaciones mencionadas.

3. El nivel de habilidad y conocimiento de aquellos versados en la técnica

En este caso, aquellos versados en la técnica deben estar bien enterados con las relaciones estructura-función de los polipéptidos FVII. Las relaciones estructura/función de muchos de los residuos de aminoácidos y actividades y propiedades de FVII eran bien conocidas antes de la fecha más temprana de prioridad reclamada. Muchos mutantes FVII y sus efectos sobre la estructura se detallan en la solicitud y fueron reproducidos antes y discutidos antes y enseguida.

El FVII es una proteína bien conocida y bien caracterizada para la cual las variantes, especies y formas modificadas de la misma han sido producidas, como se conoce bien en la técnica; esta es una proteína de gran valor terapéutico y comercial. Por lo cual, existe un gran cuerpo en la técnica que describe las mutaciones en el FVII y los efectos de cada mutación en la función del FVII. Estas incluyen mutaciones que afectan la actividad coagulante, mutaciones que son benignas y mutaciones que disminuyen la actividad. Además, se conocen variantes humanas de ocurrencia natural, incluyen aquellas que exhiben actividad aberrante. Así, la persona versada puede fácilmente seleccionar mutaciones **adicionales** de entre las muchas reportadas para lograr un resultado deseado. Las mutaciones en cerca de dos tercios de las posiciones de aminoácidos en el polipéptido y los efectos de estas han sido ya descritas, así, evidenciando un gran cuerpo de conocimiento respecto de las relaciones entre estructura y función de los polipéptidos FVII, y por lo tanto, en posesión de la solicitante. Más aún, antes de la fecha más temprana de prioridad reclamada en la presente solicitud, se conocían bien relaciones significativas de estructura/función fueron reportadas entre residuos FVII y actividad del FVII. La identidad y funciones de los dominios de FVII fueron reportados en el arte previo y son descritos en la especificación (ver, por ejemplo, en la página 22, líneas 28-34). Tales dominios pueden ser identificados con base en alineaciones del FVII con otros miembros de la familia de factores de coagulación (ver, por ejemplo, en la página 75, línea 22 a página 76, línea 2). Además, una persona versada en la materia conoce, y la especificación describe, los componentes estructurales, incluyendo residuos de aminoácidos requeridos para glicosilación, activación de escisión y/o activación de FVII; y modificaciones post-translacionales, requeridas para la secreción y actividad de un polipéptido FVII, incluyendo γ -carboxilación, que se requiere para el ligado del Ca^{2+} , la interacción con el

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

dominio de terminal C del Factor de Tejido y el ligado de fosfolípidos (ver. Por ejemplo, página 68, línea 9 a página 70, línea 30) de la correspondiente solicitud internacional.

Al menos cerca de dos tercios, si no más, de todos los residuos de FVII (pero sin incluir la combinación 286R/298Q ni las mutaciones P129A o T128N/P129A, descubiertas en la presente solicitud) y combinaciones de estos han sido remplazados y los remplazos de regiones y porciones de los mismos, tal como el dominio Gla y porciones de este, y los efectos de los remplazos han sido reportados. Ver, por ejemplo, las siguientes referencias (copias de las referencias que no son patentes serán enviadas por correo separado):

International PCT application No. WO 88/10295
 International PCT application No WO2001/83725
 International PCT application No. WO2002/022776
 International PCT application No. WO2003/027147
 International PCT application No WO2004/111242
 International PCT application No. WO2004/108763
 International PCT application No. WO2004/029090
 International PCT application No. WO 2004/029091
 International PCT application No. WO 2005/123916
 International PCT application No. WO2008/127702
 U.S. Patent No.5,580,560
 U.S. Patent No. 6,806,063
 Arbini (1996) Blood 87(12):5085-94
 Bernardi et al. (1994) Br J Haematol. 86:610-8
 Bharadwaj (1996) J Biol Chem. 271(48):30685-91
 Brophy et al. (2007) Haemophilia. 13(5):533-41
 Chafa, J. Thromb Haemost. 2005 3(1):175-7
 Chaing et al. (1994) Blood 83(12):3524-35
 Chang et al. (1999) Biochemistry 38(34):10940-8.
 Dickinson, Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 93(25):14379-84
 D'Andrea et al. (2004) Haematologica. 89(8):979-84
 Etro et al. (2005) J. Hematology 88(12):1434-1436;
 Fromovich-Amit, J Thromb Haemost. 2004 2(10):1774-81
 Furlan (2003) J Thromb Haemost. 1(11):2455-7
 Furlan (2004) Haematologica. 89(12):1504-9
 Hahn, Genetics. 2004 167(2):867-77
 Harvey SB, J Biol Chem. 2003 Mar 7;278(10):8363-9
 Hunault et al. (1999) Blood 93(4):1237-1244
 Hunault et al. (1999) Br J Haematol. 105(4):1101-8
 Iino (1998) Arch Biochem Biophys 352(2):182-92
 Katsumi et al. (2000) Thromb Haemost. 83(2):239-43
 Kavlie (1998) Thromb Haemost. 79(6):1136-43
 Kavlie et al. (2004) Thromb Haemost. 91(1):28-37.
 Kembell-Cook (1998) J Biol Chem 273(14):8516-21
 Lee et al. (2008) Blood Coagul Fibrinolysis 19(1):92-4

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

- Leonard (1998) Blood 91(1):142-8.
 Mariani et al. (2005) Thromb Haemost 93:481-487
 Matsushita (1994) J. Biol Chem. 269(10):7355-63
 Maun et al. (2005) Prot Sci 14:1171-1180
 Menegatti, Am J Hematol. 2004 77(1):90-1
 Neuenschwander et al. (1995) Biochemistry 34:8701-8707
 Olsen et al. (2004) Biochemistry 43:14096-14103
 Persson, Biochem J. 2004 379(Pt 2):497-503
 Peyvandi et al. (2000) Thromb Haemost. 84(2):250-7
 Peyvandi et al. (2002) Thromb Haemost. 88(5):750-5;
 Shah et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1998) 95:4229-4234
 Shikata et al. (2004) Haemost. Thromb. Vasc. Biol. 103(7):2630-2635
 Soejima et al. (2001) J Biol Chem 276:17229-17235
 Takamiya (2002) Clin Lab Haematol. 24(4):233-8
 Takamiya (2005) Thromb Haemost. 93(3):414-9.
 Williamson et al. (2005) J. Thromb. Haemost. 3(6):1250-1256
 Wu et. al (2006) Acta Haematol. 116(2):96-100
 Zhidong and Xiaojun (2007) Thromb Haemost 98:687-688

Aquellos versados en la técnica tienen un buen entendimiento de la estructura y la función del polipéptido FVII, tal que la presente solicitud hubiera sido posesión de ese conocimiento al momento de la fecha más temprana de la prioridad reclamada por la presente solicitud.

De otra parte, en el oficio en cuestión se ha indicado que las reivindicaciones 3 a 5 no son concisas porque se refieren a la misma materia objeto. Adicionalmente, se establece que tales reivindicaciones no son claras porque describen un péptido no modificado. La base para este rechazo por parte de la SIC *no es clara*. La reivindicación 1 menciona que el polipéptido FVII no modificado tiene una secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NOs:1 – 3 y 18 – 74. Las reivindicaciones dependientes mencionan un subconjunto de los polipéptidos FVII no modificados en los cuales se introducen las sustituciones de aminoácidos. Así, las reivindicaciones dependientes mencionan un subconjunto de polipéptidos abarcados por la reivindicación 1.

En relación con que las reivindicaciones 8, 9 y 10 se califican como no claras porque las reivindicaciones 8 y 9 describen péptidos mediante indicar las sustituciones hechas, pero por otro lado, la reivindicación 10 describe péptidos por sus SEQ ID NO. Se ha eliminado la reivindicación 10, por ser redundante con las reivindicaciones 8 y 9.

Las SEQ ID NOs:1 y 2 recitan la secuencia de los polipéptidos FVII precursores humanos; la SEQ ID NO:3 recita la secuencia de la forma madura de las SEQ ID NOs: 1 y 2; las SEQ ID NOs: 18 – 74 establecidas en las secuencias de otras especies y variantes conocidas de FVII. La reivindicación identifica claramente el aminoácido que es remplazado en cada una de las SEQ ID NOs: 1 – 3 y 18 – 74.

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

En consecuencia, nos permitimos informar que las nuevas reivindicaciones 1 a 14 se ajustan a las disposiciones del artículo 30 de la Decisión 486.

3. Reivindicaciones de Uso

Se cancelan las antiguas reivindicaciones 30 a 33.

4. Nivel Inventivo

El examinador establece en su concepto técnico que las antiguas reivindicaciones 1 a 29 de la presente solicitud carecen de nivel inventivo a la luz de los documentos D1 (Bjelke y colaboradores) y D2 (WO2007031559).

Discusión del arte citado

Como se discutió con anterioridad la presente solicitud muestra que la mutación Q286R incrementa de manera significativa la actividad coagulante. La solicitud suministra más de 200 ejemplos. Las mutaciones adicionales, particularmente aquellas mencionadas en las reivindicaciones dependientes, no destruyen este incremento, y en algunos casos lo promueven. Como se discute adelante, ambas referencias D1 y D2, al igual que otro arte previo, enseñan específicamente que una mutación en Q286 es perjudicial, y D1 enseña específicamente que Q286R es perjudicial; ninguna referencia sugiere que un polipéptido FVII que contenga Q286R exhibe una actividad incrementada.

La solicitud muestra que la mutación 286R, sola y en combinación con otras mutaciones, incluyendo la 298Q confiere propiedades no enseñadas ni sugeridas por el arte citado. En particular, el arte citado, D1 Bjelke et al. solo describe un polipéptido **quimérico FVII/FX** que incluye el remplazo 286R como parte de intercambio de bucle de FX, y, por lo tanto, incluye la 286R en combinación con más de una docena de otras mutaciones, incluyendo el bucle FX. D1 Bjelke et al. enseña específicamente que la mutación 286R es una mutación perjudicial.

La otra referencia D2 Ostergaard et al. (WO2007/031559) no habla de 286R como una mutación particular. La única mutación preparada es Q286A. Q286A no confiere ninguna propiedad ventajosa, y de hecho, se muestra en D2 Ostergaard et al. (WO2007/031559) y en otros artes previos que disminuye la actividad de los polipéptidos FVII. Así, la persona versada en la materia esperaría que un polipéptido que comprende una mutación en Q286 exhiba actividad reducida.

Contrario a las enseñanzas de Bjelke et al. y los resultados descritos para la mutación 286A, el remplazo del residuo correspondiente a Q286 con R no es perjudicial, sino que resulta en un incremento sustancial de la actividad coagulante del polipéptido FVII. Además, reivindicación llama SEQ ID Nos específicas, y por lo tanto, reivindica polipéptidos que incluyen mutaciones particulares. Ninguna de las referencias D1 o D2, individualmente o en combinación enseñan o sugieren esta combinación de mutaciones, ni que la mutación Q286R puede incrementar la actividad. La referencia D1 establece que es perjudicial, y la referencia D2 describe que Q286A no es una

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

mutación deseable (ver la discusión que sigue), no mencionan ningún otro remplazo en Q286. Por lo tanto, todas las reivindicaciones que presento son inventivas.

D1 Bjelke et al.

D1 Bjelke et al. ((2007) FEBS Letters 581:71-76), que incluye un autor (Ole H. Olsen) en común con un inventor adjunto de D2 WO2007/031559, está dirigido a estudios que investigan el papel del bucle Gly283-Met298 del FVII en especificidad del sustrato macromolecular. Así, D1 está determinando la especificidad del sustrato. Como se estableció en la página 72, col. 1 primer párrafo, D1 “explora” el ambiente molecular en FVIIa requerido para acomodar una lisina en la posición 298, que en general ha mostrado tener efectos perjudiciales sobre la actividad FVII. Para estudiar esto e identificar un ambiente molecular en el cual la mutación 298K no sea perjudicial, D1 preparó mutantes FVIIa en los cuales el bucle Gly283-Met298 del FVII es remplazado con el bucle correspondiente del FX, el cual tiene una lisina en la posición correspondiente a 298.

Para lograr esto, D1 prepara un polipéptido quimérico FVIIa/FX que contiene 16 injertos de remplazos de aminoácidos del bucle FX correspondiente. Debido a la inserción de bucle FX, el polipéptido resultante contiene, entre otros remplazos en el bucle, una arginina en la posición 286, que es el residuo de aminoácidos nativo en FX en esta posición en el bucle. Así, el polipéptido quimérico comprende la Q286R, pero en conjunto con otros 15 remplazos, y no conjugados con M298Q, ni en un polipéptido que contiene solamente 7 o menos remplazos de aminoácidos.

D1 describe estudios que investigan el papel del bucle Gly283-Met298 del FVII en la especificidad del sustrato macromolecular. En un mutante, el mutante designado FVIIa_{bucle FX}, descrito en D1 es 286 remplazado porque es parte del bucle FVII que es remplazado por un bucle FX para producir el polipéptido quimérico. Como se describió en D1, este mutante es preparado para poder introducir un Lys (K) en 298, no una Q mediante construir un polipéptido quimérico FX-FVII. Como se estableció previamente, este polipéptido quimérico FVII contiene 16 injertos de remplazo de aminoácidos del bucle FX correspondiente lo mismo que tres mutaciones adicionales de “reparación” (las mutaciones E, G y Q en las posiciones 158, 176 y 341), respectivamente). Estas mutaciones de “reparaciones” requeridas no se encuentran en los polipéptidos reivindicados en la presente.

Debido a la inserción del bucle FX, el polipéptido resultante contiene, entre numerosos otros remplazos en el bucle, una arginina (R) en la posición 286, que es el residuo de aminoácido nativo en FX en esa posición en el bucle. Este polipéptido quimérico comprende Q286R, pero en conjunto con otros 19 remplazos (resultando en 15 diferencias en los aminoácidos (Ver, Fig. 1A en D1)):

	283	298
FVIIa tipo silvestre:	GWGQLLDRGATALEIM	
FVIIa _{FXLoop} :	GFGRTHEKGRQSTREK	

Como se anotó, el mutante FVIIa_{bucle FX} también tiene lo que D1 llama la “reparación” adicional: las mutaciones E, G y Q en las posiciones 158 (21), 176(40) y 341 (192), respectivamente, en donde el número en paréntesis es la numeración quimotripsina de

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

la posición (ver página 73, col. 1).

Estas mutaciones de reparación fueron introducidas porque D1 enseña que existen interacciones desfavorables de los residuos en el bucle FX. D1 describe específicamente la mutación Q286R del bucle FX como **perjudicial**. D1 Bjelke et al. establece que debido a las “interacciones no favorables con ... Gln^{286{143}}Arg,” la mutación K341Q (que es K192Q según la numeración quimotripsina), fue introducida para compensar por la introducción de la Q286R. Así, Q286R es introducida, pero como parte de un remplazo de 16 aminoácidos para producir un polipéptido quimérico FX-FVII y se enseñó para requerir mutaciones de reparación. D1 no contempla un polipéptido FVII con Q286R ni con Q286R/M298Q ni que Q286R **no es perjudicial** sino ventajoso. D1 no contempla un polipéptido FVII que contenga Q286R pero no contenga la mutación de reparación K341Q.

Así, D1 Bjelke et al. **no** describe ningún polipéptido que comprenda Q286R con solamente hasta 7 remplazos de aminoácidos, y sin las mutaciones de reparación. D1 Bjelke et al., **no** sugiere que la mutación 286R, sola, o con una o más de otras mutaciones podría resultar en un polipéptido FVII modificado que tenga actividad coagulante incrementada y ciertamente no sin la mutación de “reparación” requerida. Bjelke et al. indica que una mutación específica compensatoria (mutaciones de reparación) se requiere para aún retener la actividad, indicando claramente que la mutación 286R afecta perjudicialmente la actividad, y ciertamente no sugiere que los polipéptidos aquí reivindicados, que no incluyen esta mutación, podrían no solamente retener la actividad sino exhibir un incremento en la actividad. . Ver, también, la presente solicitud, en, por ejemplo, la página 81 de la correspondiente solicitud internacional, que establece [énfasis agregado]:

Q286 está localizado adyacente a y en contacto con residuos que forman regiones del sitio activo y hendidura del sitio activo del polipéptido FVII. **Como tal, se ha establecido que la modificación en este sitio debería resultar en actividad catalítica reducida** (ver por ejemplo, la patente Estadounidense No. 6806063). Esto ha sido **demostrado** en estudios previos (ver, por ejemplo, Pub. De Pat. Internacional No. WO2007/031559 [Ostergaard et al.], en donde el residuo glutamina fue remplazado con una alanina (Q286A). El polipéptido FVIIa modificado resultante exhibe una habilidad reducida para activar el Factor X comparado con el polipéptido tipo silvestre. En otros estudios, la misma mutación no tenía esencialmente efectos sobre la actividad catalítica del mutante FVIIa por el Factor X (Dickinson et al., (1996) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 93:14379-14384) o un sustrato sintético (Publicación Patente Internacional No. WO2007031559).

Como se demostró aquí (ver ejemplo 4 y abajo), sin embargo, la modificación del polipéptido FVII establecida en la SEQ ID NO: 3; correspondiente a la posición 143 según la numeración quimotripsina), particularmente con un residuo básico, tal como arginina (Arg, R), resulta en un polipéptido FVII modificado con actividad catalítica y coagulante incrementada.

D1 **no** describe un polipéptido FVII que contenga 286R en un polipéptido FVII con

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

hasta 7 remplazos de aminoácidos, ninguno de los cuales son la mutación de “reparación” que D1 afirma que es necesaria para retener la actividad. D1 no aprecia de ninguna manera que la 286R, particularmente en combinación con la 298Q mejora significativamente la actividad catalítica del polipéptido FVII, y que lo hace sin necesidad de mutaciones “compensatorias” o “de reparación”. Ver también, la presente solicitud, en, por ejemplo, las páginas 88-89 de la correspondiente solicitud internacional, donde se establece que:

Q286 está localizado adyacente a y en contacto con residuos que forman regiones del sitio activo y hendidura del sitio activo del polipéptido FVII. Como tal, se ha establecido que la modificación en esta posición debería resultar en actividad catalítica reducida (ver por ejemplo, la patente Estadounidense No. 6806063). Esto ha sido demostrado en estudios previos (ver, por ejemplo, Pub. De Pat. Internacional No. WO2007/031559 [Ostergaard et al.], en donde el residuo glutamina fue remplazado con una alanina (Q286A). El polipéptido FVIIa modificado resultante exhibe una habilidad reducida para activar el Factor X comparado con el polipéptido tipo silvestre. En otros estudios, la misma mutación no tenía esencialmente efectos sobre la actividad catalítica del mutante FVIIa por el Factor X (Dickinson et al., (1996) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 93:14379-14384) o un sustrato sintético (Publicación Patente Internacional No. WO2007031559) [Ostergaard et al.].

Como se demostró aquí (ver ejemplo 4 y abajo), sin embargo, la modificación del polipéptido FVII en la posición 286 (numeración correspondiente a un polipéptido FVII maduro establecida en la SEQ ID NO: 3; correspondiente a la posición 143 según la numeración quimotripsina), particularmente con un residuo básico, tal como arginina (Arg, R), resulta en un polipéptido FVII modificado con actividad catalítica y coagulante incrementada.

Como se muestra en la presente solicitud, la mutación correspondiente a la 286R no solamente no es perjudicial (como se enseñó por D1, ver también, la Patente US No. 6.806.063), sino que los polipéptidos FVII que comprenden esta mutación exhiben una muy alta actividad (ver la discusión que sigue y las tablas reproducidas adelante). Los datos que evidencian esto se dan en la solicitud, incluso en las tablas reproducidas adelante. Por lo tanto, los polipéptidos FVII que comprenden mutaciones 286R/298Q no pueden ser obvios.

Es la presente solicitud la que demuestra que la mutación Q286R no es perjudicial como lo indica D1, sino de hecho es ventajosa, aún cuando es introducida sola, lo que demuestra que D1 es incorrecto. Por ejemplo, cuando se determina la actividad catalítica de una modificación variante de FVII que contiene solamente la mutación Q286R, se demostró en la presente solicitud que los polipéptidos FVII que contienen esta mutación exhiben una actividad catalítica incrementada para el sustrato, FX, en comparación con un polipéptido FVII sin modificar (ver por ejemplo, las Tablas 14 y 15 en la solicitud). Por ejemplo, como se demostró en el ejemplo 4, un polipéptido FVIIa que contiene la mutación Q286R (Q134R para la numeración de quimotripsina) como la única modificación exhibe actividad catalítica para FX en la presencia o

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

ausencia de TF que es aproximadamente entre **dos a cuatro veces más grande** que la actividad catalítica exhibida por el FVII tipo silvestre.

Como se presentó en los Ejemplos de la solicitud como se presentó, como por ejemplo, en la Tabla 24, muchas de las variantes FVII que contienen la Q286R sola y con una o más de otras mutaciones también exhiben actividad coagulante incrementada comparada con un polipéptido FVII que no contenga esta mutación. Se muestra en la presente solicitud, que los polipéptidos FVII que contienen la mutación 286R exhiben una actividad significativamente incrementada en la presencia y ausencia del factor de tejido, y que polipéptidos con la combinación Q286R/M298Q exhiben una actividad **mucho mayor**.

En el Ejemplo 4, Tablas 14 y 15, reproducidas adelante, se suministran los resultados de los ensayos indirectos dependientes del Factor de Tejido (TF) y los ensayos independientes de TF que miden la actividad catalítica de los polipéptidos FVII modificados que incluyen modificaciones individuales, dobles o múltiples de aminoácidos. Entre los polipéptidos FVII modificados como ejemplo están los polipéptidos con modificaciones en las posiciones 286 y 298, como también en combinación con mutaciones adicionales, incluidas las mutaciones en las posiciones 128, 129, 286 y 298 y otras mutaciones mencionadas en la reivindicación 1. En las tablas reproducidas adelante, los polipéptidos que contienen el remplazo Q286R se resaltan. La última columna compara el k_{cat}/K_M con el tipo silvestre. Puede verse que los mutantes con Q286R, sola, y en combinación con otras mutaciones, exhibe una actividad significativamente incrementada.

Bjelke et al., no sugiere que la Q286R puede ser explotada como una mutación sola o en combinación con cualquier otra mutación para incrementar la actividad en el polipéptido FVII. El único polipéptido mutante de Bjelke et al. es un polipéptido FVII/FX quimérico que sucede que incluye un R en la posición de FX correspondiente a Q286 en FVII pero incluye 14 otras mutaciones incluyendo mutaciones diseñadas para compensar las mutaciones introducidas por intercambio de bucles.

Así, el arte previo citado D1 al igual que los otros artes previos, tales como la Patente US No. 6.806.063 y D2, que se discuten adelante, enseñan que el remplazo de aminoácidos en Q286 **reduce la actividad**.

D2 Solicitud Internacional PCT No. WO2007/031559

Diferencias entre la divulgación de D2 Ostergaard et al. (WO2007/031559 y las reivindicaciones presentes

Como se discutió, todas las reivindicaciones pendientes requieren que las mutaciones correspondan a Q286R. D2 Ostergaard et al. no enseña un polipéptido FVII con la mutación Q286R. Para seleccionar Q286R o Q286R/M298Q requiere **picar y escoger entre miles de diferentes opciones** enseñadas en D2 Ostergaard et al.

Con respecto a Q286, D2 Ostergaard et al. establece que "Q286 es remplazado con cualquier otro aminoácido." Como se discutió más adelante, D2 Ostergaard et al. establece que cualquier otro aminoácido es "seleccionado entre Gly, Ala, Val, Leu, Ile,

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Phe, Met, Trp, Tyr, Asp, Asn, Glu, His, Lys, Arg, Cys, Thr, Ser,” lo que es una recitación de todos los otros 18 aminoácidos. Esto no es más que una divulgación para decir que el residuo Q286 puede ser remplazado.

D2 Ostergaard et al. enseña que Q286 puede ser remplazado, pero no selecciona Arg(R) entre todos los otros aminoácidos. D2 Ostergaard et al., selecciona Ala entre los aminoácidos. Así, D2 Ostergaard et al., solamente enseña que Q286 puede ser remplazado, y solamente enseña un polipéptido FVII que comprende **Q286A**. D2 Ostergaard et al., no enseña un polipéptido que comprenda Q286R. D2 enseña que, de acuerdo con los hallazgos en otros arts previos, Q286A no es una buena mutación. D2 no sugiere Q286R.

Enseñanzas en D2 Ostergaard et al. con respecto a Q286

Ostergaard et al. no divulga un polipéptido que contenga la mutación Q286R. LA solicitante ha revisado en detalle e identifica toda la descripción, incluyendo las reivindicaciones como se presentaron originalmente, dirigidas a Q286 en D2 Ostergaard et al. La divulgación con respecto a 286 es como sigue: En los párrafos [0013]-[0018], [0022], [0035], [0039], [00168], [0198], y [0199] D2 Ostergaard *et al.* recita los polipéptidos FVII, células hospedadoras, animales y plantas transgénicos que contienen el polipéptido FVII y, las moléculas de ácido nucleico que codifican, en donde el polipéptido FVII comprende una o más sustituciones que son:

Remplazo con cualquier otro aminoácido de uno o más aminoácidos en una posición seleccionada del grupo que consiste de las posiciones 172, 173, 175, 176, 177, 196, 197, 198, 199, 200, 203, 235, 237, 238, 239, 240, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 297, 299, 319, 320, 321, 327, 341, 363, 364, 365, 366, 367, 370, 373 correspondientes a posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 y en donde el polipéptido de Factor FVII ha incrementado su vida promedio funcional in vivo comparada con el Factor VIIa tipo silvestre humano.

En los párrafos siguientes a estos, D2 Ostergaard et al. establece que los residuos en cada una de estas posiciones pueden ser remplazados por cualquier aminoácido:

[0057] En una modalidad adicional de la invención, el polipéptido de factor VII es un polipéptido en donde Q286 es remplazado con cualquier otro aminoácido. [ver, también el párrafo 0218].

En los párrafos subsiguientes, D2 Ostergaard et al. recita cada una de las posiciones 172, 173, 175, 176, 177, 196, 197, 198, 199, 200, 203, 235, 237, 238, 239, 240, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 297, 299, 319, 320, 321, 327, 341, 363, 364, 365, 366, 367, 370, 373, y establece que los otros 18 aminoácidos pueden remplazar al aminoácido nativo en cada una de estas 40 posiciones. D2 Ostergaard et al. hace esto para cada una de las 40 posiciones. Q286 se menciona en el párrafo [0090]. D2 Ostergaard et al. también establece que los polipéptidos FVII pueden incluir remplazos adicionales, tales como los residuos entre 157-170 y 390-405 (otras 30 posiciones además de las 40 listadas anteriormente pueden ser remplazadas):

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

[0137] En una modalidad adicional de la invención, el polipéptido de Factor VII es un polipéptido en donde al menos un aminoácido correspondiente a un aminoácido en una posición seleccionada entre 157-170 de la SEQ ID NO:1 ha sido remplazado con cualquier otro aminoácido.

[0138] En una modalidad adicional de la invención, el polipéptido de Factor VII es un polipéptido en donde al menos un aminoácido correspondiente a un aminoácido en una posición seleccionada entre 290-305 de la SEQ ID NO:1 ha sido remplazado con cualquier otro aminoácido.

Así, el remplazo del residuo de aminoácido en 286 está entre una muy larga lista de posibles remplazos. En el párrafo [0166], D2 Ostergaard et al. enseña el único remplazo específico en 286:

[0166] En una modalidad adicional de la invención, el polipéptido de Factor VII es seleccionado entre Q176A-FVII, Q176L-FVII, L177S-FVII, D196A-FVII, K197A-FVII, K199A-FVII, T238A-FVII, T239I-FVII, T239Y-FVII, **Q286A-FVII**, D289E-FVII, D289R-FVII, R290Q-FVII, M327Q-FVII, M327N-FVII, K341A-FVII, K341E-FVII, K341Q-FVII, S363M-FVII, S363A-FVII, W364H-FVII, Q366E-FVII. [ver también el párrafo [0268]]

El ejemplo 7 en D2 Ostergaard et al. describe el mutante Q286A y muestra que tiene cerca de 93% de actividad amidolítica comparada con el FVII tipo silvestre, 83% de activación FX comparada con el FVII tipo silvestre y cerca del 77% de inhibición ATIII comparada con el tipo silvestre. La figura 2 resume estos datos con respecto a los mutantes e identifica mutantes promisorios (círculos coloreados). La Q286A se ilustra, pero **no** se identifica como un mutante promisorio, ya que exhibe actividades relativamente bajas y no una inhibición ATIII significativamente disminuida.

Así, la sola mutación específica (aparte de la recitación general de que Q286 puede ser remplazado con cualquier aminoácido) en 286 que es enseñada es la Q286A, y esta resulta en una actividad menor. El péptido modificado con esta mutación no se identificó como una mutación promisorio. El ejemplo 7 en D2 Ostergaard et al. describe el mutante Q286A y muestra que este tiene cerca de un 7% en pérdida de actividad comparado con el FVII tipo silvestre, 15% de disminución en la activación de FX, y cerca de 77% de inhibición ATIII comparada con el tipo silvestre. La Figura 2 de D2 Ostergaard et al. resume los datos con respecto a los mutantes e identifica los mutantes promisorios (círculos coloreados). La Q286A se ilustra, pero **no** se identifica como un mutante promisorio, ya que exhibe actividades relativamente bajas y no una inhibición ATIII significativamente disminuida.

Como se discutió en la solicitud, reproducida aquí, la mutación Q286A fue descrita en el arte previo a D2 Ostergaard et al. Tales divulgaciones (ver, por ejemplo Dickinson et al. (1996) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 93:14379-14384, and la Patente U.S. No. 6,806,063) mostraron que esta mutación no tiene un efecto ventajoso. D2 Bjelke et al. enseña específicamente que introducir 286R en un polipéptido FVII es perjudicial. Por lo tanto, una persona versada en la materia hubiera esperado que las mutaciones en 286

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

afecten adversamente la actividad del polipéptido resultante. La mutación Q289R confiere resultados no enseñados ni sugeridos por D2 Ostergaard et al.

Es la presente solicitud la que demuestra que la mutación Q286R no es perjudicial, y de hecho, es ventajosa, aún cuando se introduzca sola. Por ejemplo, cuando se determina la actividad catalítica de una modificación variante de FVII que contiene solamente la mutación Q286R, se demostró en la presente solicitud que los polipéptidos FVII que contienen esta mutación exhiben una actividad catalítica incrementada para el sustrato, FX, en comparación con un polipéptido FVII sin modificar (ver por ejemplo, las Tablas 14 y 15 en la solicitud). Por ejemplo, como se demostró en el ejemplo 4, un polipéptido FVIIa que contiene la mutación Q286R (Q134R para la numeración de quimotripsina) como la única modificación exhibe actividad catalítica para FX en la presencia o ausencia de TF que es aproximadamente entre **dos a cuatro veces más grande** que la actividad catalítica exhibida por el FVII tipo silvestre. Como se presentó en los Ejemplos de la solicitud tal como se presentó, por ejemplo, en la Tabla 24, en las páginas 276-280, muchas de las variantes FVII que contienen la Q286R y una o más de otras mutaciones también exhiben propiedades significativamente mejoradas comparadas con un polipéptido FVII no modificado. Se muestra en la presente solicitud, que los polipéptidos FVII que contienen la mutación 286R exhiben una actividad significativamente incrementada en la presencia y ausencia del factor de tejido, y que polipéptidos con la combinación 286R/298Q exhiben una actividad **mucho** mayor.

En el Ejemplo 4, Tablas 14 y 15, reproducidas adelante, se suministran los resultados de los ensayos indirectos dependientes del Factor de Tejido (TF) y los ensayos independientes de TF que miden la actividad catalítica de los polipéptidos FVII modificados que incluyen modificaciones individuales, dobles o múltiples de aminoácidos. Entre los polipéptidos FVII modificados como ejemplo están los polipéptidos con las modificaciones en 286R.

D. Discusión

D1 suministra un polipéptido quimérico FVII y enseña que la mutación Q286R es perjudicial. D1 no suministra ninguna enseñanza o sugerencia de que un polipéptido FVII que contenga la mutación Q286R podría tener una actividad coagulante incrementada.

Con respecto a la mutación en 286, D2 Ostergaard et al. solo enseña que el residuo en esta posición puede ser remplazado con cualquier aminoácido, D2 Ostergaard et al., no selecciona R entre todos los posibles aminoácidos. De hecho, la última publicación, D1 Bjelke et al., que incluye un autor (Ole H. Olsen) común con un coinventor de Ostergaard et al., describe específicamente la mutación Q286R como **perjudicial**. Así, ni D1 Bjelke et al., ni D2 Ostergaard et al., podrían haber sugerido un polipéptido que contenga Q286R, ya que la única ejemplificación en esta posición (Q286A) exhibe actividad reducida y otras actividades no deseables y D1 enseña que es perjudicial. D2 Ostergaard et al., no menciona esta mutación. Es evidente que al momento de

Clarke, Modet & Cº

COLOMBIA

presentar la presente solicitud, cualquier entendimiento respecto de tal remplazo, es que este es perjudicial. Se requeriría un conocimiento y entendimiento de la presente solicitud para haber seleccionado R como aminoácido de remplazo.

La presente solicitud muestra que contrario a las enseñanzas específicas de D1, no se requiere de mutaciones compensatorias para contrarrestar los efectos perjudiciales que se alegan de la mutación Q286R. Las presentes reivindicaciones no abarcan polipéptidos con mutación de reparación. Los polipéptidos con solo la mutación Q286R sola exhiben actividad incrementada, como también la tiene el polipéptido que contiene Q286R en combinación con una variedad de otras mutaciones como se establece en las reivindicaciones (Ver, por ejemplño, Tablas 14 y 15, que se reproducen adelante).

Los datos reproducidos de la solicitud muestran claramente que la mutación Q286R consistentemente y reproduciblemente incrementan la actividad catalítica. Los mutantes resaltados incluyen aquellos mencionados en la reivindicación 1. Ver, también la primera Tabla anterior, que muestra la actividad para los polipéptidos reivindicados.

Tabla 14. Actividad catalítica de las variantes FVIIa

Ensayo indirecto dependiente de TF con Polipéptidos FVIIa de células 293-F				
Mutación (numeración del FVII maduro)	Mutación (numeración de la quimotripsina)	Forma de ensayo en	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (%) PESO)
Q286N	Q143N	hyperbolic	4.88 x 10 ⁷	100
Q286E	Q143E	hyperbolic	1.14 x 10 ⁷	23
Q286D	Q143D	hyperbolic	6.04 x 10 ⁶	12
Q286S	Q143S	hyperbolic	4.64 x 10 ⁷	95
Q286T	Q143T	hyperbolic	2.44 x 10 ⁷	50
Q286R	Q143R	linear	1.11 x 10 ⁸	323
Q286K	Q143K	hyperbolic	5.44 x 10 ⁷	112
Q286A	Q143A	hyperbolic	8.55 x 10 ⁷	175
Q286V	Q143V	hyperbolic	1.65 x 10 ⁷	34
H216S	H76S	linear	4.74 x 10 ⁷	138
H216A	H76A	linear	5.98 x 10 ⁷	175
H216K	H76K	hyperbolic	6.51 x 10 ⁷	133
H216R	H76R	hyperbolic	9.44 x 10 ⁷	193
S222A	S82A	linear	5.73 x 10 ⁷	167

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Ensayo indirecto dependiente de TF con Polipéptidos FVIIa de células 293-F				
Mutación (numeración del FVII maduro)	Mutación (numeración de la quimotripsina)	Forma de ensayo en	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat}/K_M (%) PESO
S222K	S82K	linear	8.02×10^7	234
H257A	H117A	linear	3.90×10^7	114
H257S	H117S	linear	5.90×10^7	172
K161S	K24S	hyperbo lic	5.99×10^7	123
K161A	K24A	linear	4.22×10^7	123
K161V	K24V	hyperbo lic	5.45×10^7	112
H373D	H224D	linear	1.79×10^7	52
H373E	H224E	linear	2.79×10^7	81
H373S	H224S	linear	2.75×10^7	80
H373F	H224F	linear	5.11×10^7	149
H373A	H224A	linear	3.11×10^7	91
S52A	S[52]A	linear	4.66×10^7	136
S60A	S[60]A	linear	5.15×10^7	150
Q366D	Q217D	linear	1.88×10^7	55
Q366E	Q217E	linear	4.77×10^7	139
Q366N	Q217N	linear	5.64×10^7	165
Q366T	Q217T	linear	3.42×10^7	100
Q366S	Q217S	linear	2.70×10^7	79
Q366V	Q217V	linear	6.59×10^7	192
E394N/P395A/R396S	E245N/P246A/R 247S	linear	5.32×10^7	155
R202S	R62S	linear	2.57×10^7	75
A292N/A294S	A150N/A152S	linear	0	0
G318N	G170fN	linear	5.50×10^7	161
A175S	A39S	linear	3.32×10^7	97
K109N	K[109]N	linear	5.97×10^7	174
A122N/G124S	A[122]N/G[124]S	linear	5.27×10^7	154
T130N/E132S	T[130]N/E[132]S	linear	6.35×10^7	185
A122N/G124S/ E394N/P395A/R396S	A[122]N/G[124]S /E245N/P246A/ R247S	linear	4.88×10^7	142
V158T/L287T/M298K	V21T/L144T/M1 56K	linear	4.50×10^6	13
V158D/L287T/M298K	V21D/L144T/M1 56K	linear	4.48×10^6	13
S103S111delinsSFGRG DIRNV	S[103]S[111]delins SFGRGDIRNV	linear	4.83×10^7	141
P406insCSFGRGDIRN VC	P257insCSFGRG DIRNVC	linear	6.16×10^7	180
P406insGGGSCSFGRG DIRNVC	P257insGGGSCS FGRGDIRNVC	linear	7.47×10^7	218
T128N/P129A	T[128]N/P[129]A	linear	5.96×10^7	174

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Ensayo indirecto dependiente de TF con Polipéptidos FVIIa de células 293-F				
Mutación (numeración del FVII maduro)	Mutación (numeración de la quimotripsina)	Forma de ensayo en	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (% PESO)
S222A/ Gla Swap FIX	S82A/Gla swap FIX	linear	6.55 x 10 ⁷	189
H257A/ Gla Swap FIX	H117A/Gla swap FIX	linear	6.45 x 10 ⁷	186
S222A/H257A/ Gla Swap FIX	S82A/H117A/Gla swap FIX	linear	5.77 x 10 ⁷	168
<u>Q286R</u> / Gla Swap FIX	Q143R/Gla swap FIX	linear	1.11 x 10 ⁸	323
<u>Q286R</u> /H257A	Q143R/H117A	linear	1.27 x 10 ⁸	371
<u>Q286R</u> /S222A	Q143R/S82A	linear	1.42 x 10 ⁸	415
<u>Q286R</u> /S222A/H257A	Q143R/S82A/H117A	linear	9.51 x 10 ⁷	278
<u>Q286R</u> /S222A/ Gla Swap FIX	Q143R/S82A/Gla swap FIX	linear	1.61 x 10 ⁸	470
<u>Q286R</u> /H257A/ Gla Swap FIX	Q143R/H117A/ Gla swap FIX	linear	8.09 x 10 ⁷	234
<u>Q286R</u> /S222A/H257A/ Gla Swap FIX	Q143R/S82A/H117A/ Gla swap FIX	linear	7.75 x 10 ⁷	226
<u>Q286R</u> / <u>M298Q</u> /K341Q	Q143R/M156Q/ K192Q	linear	3.93 x 10 ⁷	115
<u>Q286R</u> / <u>M298Q</u> /K199E	Q143R/M156Q/ K60cE	linear	7.74 x 10 ⁷	226
T239S	T99S	linear	1.74 x 10 ⁷	51
T239Q	T99Q	linear	1.74 x 10 ⁷	51
T239V	T99V	linear	9.57 x 10 ⁷	279
T239L	T99L	linear	3.77 x 10 ⁷	110
T239H	T99H	linear	9.90 x 10 ⁶	29
T239I	T99I	linear	3.50 x 10 ⁷	102
S222A/H257A/ <u>M298Q</u>	S82A/H117A/M156Q	linear	7.75 x 10 ⁷	224
S222A/H257A/ <u>Q286R</u> / <u>M298Q</u>	S82A/H117A/Q143R/M156Q	linear	2.00 x 10 ⁸	583
S222A/H257A	S82A/H117A	linear	5.02 x 10 ⁷	147
A175S/ <u>Q286R</u> /Q366V	A39S/Q143R/Q217V	linear	8.08 x 10 ⁷	236
A175S/S222A/Q366V	A39S/S82A/Q217V	linear	3.78 x 10 ⁷	109
K109N/A175S	K[109]N/A39S	linear	3.67 x 10 ⁷	107
S222A/ <u>Q286R</u> /Q366V	S82A/Q143R/Q217V	linear	1.27 x 10 ⁸	369
Q286M	Q143M	linear	5.25 x 10 ⁷	153
Q286L	Q143L	linear	2.02 x 10 ⁷	59
Q286Y	Q143Y	linear	1.61 x 10 ⁷	47

Clarke, Modet & Cº

COLOMBIA

Ensayo indirecto dependiente de TF con Polipéptidos FVIIa de células 293-F				
Mutación (numeración del FVII maduro)	Mutación (numeración de la quimotripsina)	Forma de ensayo en	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat}/K_M (% PESO)
Q366I	Q217I	linear	9.37×10^7	274
Q366L	Q217L	linear	6.87×10^7	201
Q366M	Q217M	linear	6.61×10^7	193
S222V	S82V	linear	6.04×10^7	176
S222D	S82D	linear	5.34×10^7	156
S222N	S82N	linear	6.82×10^7	199
S222E	S82E	linear	5.48×10^7	160
H216A/H257A	H76A/H117A	linear	6.62×10^7	193
H216A/S222A	H76A/S82A	linear	5.46×10^7	159
H257S/ <u>Q286R</u>	H117S/Q143R	linear	3.93×10^7	115
H257S/Q366V	H117S/Q217V	linear	6.71×10^7	194
H257S/ <u>Q286R</u> /Q366V	H117S/Q143R/Q217V	linear	1.58×10^8	457
S222A/H257A/ <u>Q286R</u> /Q366V	S82A/H117A/Q143R/Q217V	linear	1.86×10^8	538
Q366V/H373V	Q217V/H224V	linear	1.84×10^7	53
Q366V/H373L	Q217V/H224L	linear	3.07×10^7	89
<u>Q286R</u> /H373A	Q143R/H224A	linear	5.89×10^7	172
S222A/H373A	S82A/H224A	linear	3.64×10^7	106
<u>Q286R</u> / <u>M298Q</u> /K341D	Q143R/M156Q/K192D	linear	1.18×10^7	34
<u>Q286R</u> /K341D	Q143R/K192D	linear	1.11×10^7	32
<u>Q286R</u> /Q366D	Q143R/Q217D	linear	1.53×10^7	45
<u>Q286R</u> /Q366N	Q143R/Q217N	linear	5.42×10^7	158
<u>Q286R</u> / <u>M298Q</u> /Q366D	Q143R/M156Q/Q217D	linear	1.91×10^7	56
<u>Q286R</u> / <u>M298Q</u> /Q366N	Q143R/M156Q/Q217N	linear	1.04×10^8	305
<u>Q286R</u> /H373F	Q143R/H224F	linear	9.08×10^7	265
<u>Q286R</u> / <u>M298Q</u> /H373F	Q143R/M156Q/H224F	linear	1.51×10^8	440
<u>M298Q</u> /H373F	M156Q/H224F	linear	8.49×10^7	248
S119N/L121S/A175S	S[119]N/L[121]S/A39S	linear	2.92×10^7	85
<u>T128N</u> / <u>P129A</u> /A175S	T[128]N/P[129]A/A39S	linear	2.98×10^7	87
A122N/G124S/A175S	A[122]N/G[124]S/A39S	linear	2.79×10^7	81
<u>M298Q</u>	M156Q	linear	1.4×10^8	409
Ensayo indirecto dependiente de TF con polipéptidos FVIIa de células BHK-21				
Mutacion	Mutación	Forma	k_{cat}/K_M	k_{cat}/K

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Ensayo indirecto dependiente de TF con Polipéptidos FVIIa de células 293-F				
Mutación (numeración del FVII maduro)	Mutación (numeración de la quimotripsina)	Forma de ensayo en	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat}/K_M (% PESO)
(numeración FVII maduro)	(numeración de quimotripsina)	de ensayo en	($M^{-1}s^{-1}$)	M (% PESO)
PESO	PESO	linear	5.42×10^7	100
<u>Q286R</u>	Q143R	linear	1.01×10^8	187
H216A	H76A	linear	5.98×10^7	110
S222A	S82A	linear	6.42×10^7	118
H257A	H117A	linear	4.96×10^7	91
H257S	H117S	linear	7.65×10^7	141
H373F	H224F	linear	4.82×10^7	89
S52A	S[52]A	linear	3.50×10^7	65
S60A	S[60]A	linear	3.22×10^7	59
Q366D	Q217D	linear	9.80×10^6	18
Q366N	Q217N	linear	3.44×10^7	63
Q366V	Q217V	linear	1.86×10^8	342
G318N	G170fN	linear	5.46×10^7	101
A175S	A39S	linear	2.12×10^7	39
A122N/G124S	A[122]N/G[124]S	linear	8.05×10^7	148
A51N	A[51]N	linear	1.02×10^8	188
S52A/S60A	S[52]A/S[60]A	linear	1.05×10^8	193
P406insGGGSCSFGRG DIRNVC	P257insGGGSCS FGRGDIRNVC	linear	9.54×10^7	176
S119N/L121S	S[119]N/L[121]S	linear	5.75×10^7	106
<u>T128N/P129A</u>	T[128]N/P[129]A	linear	8.76×10^7	161
<u>Q286R/S222A</u>	Q143R/S82A	linear	1.24×10^8	229
<u>Q286R/S222A/H257A</u>	Q143R/S82A/H1 17A	linear	1.06×10^8	196
<u>Q286R/S222A/ Gla Swap FIX</u>	Q143R/S82A/Gla swap FIX	linear	8.52×10^7	157
<u>Q286R/M298Q</u>	Q143R/M156Q	linear	1.85×10^8	341
<u>Q286R/M298Q/K341Q</u>	Q143R/M156Q/ K192Q	linear	3.11×10^7	57
<u>Q286R/M298Q/K199E</u>	Q143R/M156Q/ K60cE	linear	9.18×10^7	169
P321K	P170iK	linear	3.43×10^7	63
P321E	P170iE	linear	5.59×10^7	103
P321Y	P170iY	linear	4.48×10^7	83
P321S	P170iS	linear	5.53×10^7	102
T239N	T99N	linear	1.64×10^7	30
T239Q	T99Q	linear	1.70×10^7	31
T239V	T99V	linear	9.81×10^7	181
T239L	T99L	linear	5.24×10^7	97
T239H	T99H	linear	1.25×10^7	23
T239I	T99I	linear	4.67×10^7	86

Clarke, Modet & Cº

COLOMBIA

Ensayo indirecto dependiente de TF con Polipéptidos FVIIa de células 293-F					
Mutación (numeración del FVII maduro)	Mutación (numeración de la quimotripsina)	Forma de ensayo en	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat}/K_M (%) PESO)	
S222A/M298Q	S82A/M156Q	linear	7.13×10^7	131	
H257A/M298Q	H117A/M156Q	linear	1.28×10^8	236	
S222A/H257A/Q286R/M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	linear	1.94×10^8	358	
Q286R/M298Q/Gla Swap FIX	Q143R/M156Q/Gla swap FIX	linear	2.64×10^8	487	
Q286R/Q366V	Q143R/Q217V	linear	7.92×10^7	146	
A175S/Q286R/Q366V	A39S/Q143R/Q217V	linear	7.63×10^7	141	
K109N/A175S	K[109]N/A39S	linear	2.45×10^7	45	
S222A/Q286R/Q366V	S82A/Q143R/Q217V	linear	1.44×10^8	265	
Q286R/M298Q/K341D	Q143R/M156Q/K192D	linear	1.35×10^7	25	
Q286R/H373F	Q143R/H224F	linear	1.18×10^8	218	
Q286R/M298Q/H373F	Q143R/M156Q/H224F	linear	2.01×10^8	371	
M298Q/H373F	M156Q/H224F	linear	8.69×10^7	160	
A122N/G124S/A175S	A[122]N/G[124]S/A39S	linear	1.93×10^7	36	
M298Q	M156Q	linear	9.34×10^7	172	
Mutación (numeración FVII maduro)	Mutación (numeración quimotripsina)	Células 293-F		Células BHK-21	
		k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat}/K_M (%) en Peso)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat}/K_M (%) en peso)
PESO	PESO	2.26×10^1	100	1.58×10^1	100
Q286N	Q143N	3.03×10^1	134		
Q286E	Q143E	4.80	21		
Q286D	Q143D	3.50×10^{-1}	2		
Q286S	Q143S	2.66×10^1	118		
Q286T	Q143T	1.51×10^1	67		
Q286R	Q143R	4.87×10^1	215	4.08×10^1	259
Q286K	Q143K	3.95×10^1	175		
Q286A	Q143A	2.11×10^1	93		
Q286V	Q143V	2.35	10		
S222A	S82A	7.36×10^1	326	3.10×10^1	197
H257A	H117A	2.02×10^1	89	1.18x	75

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Ensayo indirecto dependiente de TF con Polipéptidos FVIIa de células 293-F					
Mutación (numeración del FVII maduro)	Mutación (numeración de la quimotripsina)	Forma de ensayo en	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (% PESO)	
				10 ¹	
H257S	H117S	1.75x 10 ¹	77	1.33x 10 ¹	84
Q366D	Q217D	6.30	28	2.30	15
Q366E	Q217E	2.38x 10 ¹	105		
Q366N	Q217N	2.26x 10 ¹	100	1.36x 10 ¹	86
Q366T	Q217T	2.48x 10 ¹	110		
Q366S	Q217S	1.02x 10 ¹	45		
Q366V	Q217V	2.90x 10 ¹	128	8.36x 10 ¹	530
A51N	A[51]N			2.07x 10 ¹	91
V158T/L287T/M298K	V21T/L144T/M156K	4.65	21		
V158D/L287T/M298K	V21D/L144T/M156K	2.50	11		
S52A/S60A	S[52]A/S[60]A			1.68x 10 ¹	106
<u>T128N/P129A</u>	T[128]N/P[129]A			1.43x 10 ¹	91
<u>Q286R</u> / Gla Swap FIX	Q143R/Gla swap FIX	4.37x 10 ¹	193		
<u>Q286R</u> /H257A	Q143R/H117A	1.07x 10 ¹	47		
<u>Q286R</u> /S222A	Q143R/S82A	1.00x 10 ²	444	3.18x 10 ¹	202
<u>Q286R</u> /S222A/H257A	Q143R/S82A/H117A			9.60x 10 ¹	61
<u>Q286R</u> /S222A/Gla Swap FIX	Q143R/S82A/Gla swap FIX	1.82x 10 ²	804	3.63x 10 ¹	230
<u>Q286R</u> /S222A/H257A/Gla Swap FIX	Q143R/S82A/H117A/Gla swap FIX	2.79x 10 ¹	123		
<u>Q286R</u> /M298Q	Q143R/M156Q			3.02x 10 ²	1916
<u>Q286R</u> /M298Q/K341Q	Q143R/M156Q/K192Q	1.50x 10 ²	665	3.65x 10 ²	2319
<u>Q286R</u> /M298Q/K199E	Q143R/M156Q/K60cE	8.69x 10 ¹	385	2.29x 10 ²	1451
P321K	P170iK			1.13x 10 ¹	71

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Ensayo indirecto dependiente de TF con Polipéptidos FVIIa de células 293-F					
Mutación (numeración del FVII maduro)		Mutación (numeración de la quimotripsina)	Forma de ensayo en	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (%) PESO
S222A/M298Q	S82A/M156Q			7.85x 10 ²	4981
H257A/M298Q	H117A/M156Q			4.12x 10 ¹	262
S222A/H257A/Q286R/M298Q	S82A/H117A/Q143R/M156Q	6.09x 10 ²	2695	1.90x 10 ²	1208
Q286R/M298Q/Gla Swap FIX	Q143R/M156Q/Gla swap FIX			7.52x 10 ²	4775
Q286R/Q366V	Q143R/Q217V			2.38x 10 ¹	151
A175S/Q286R/Q366V	A39S/Q143R/Q217V	3.87x 10 ¹	171	1.23x 10 ¹	78
S222A/Q286R/Q366V	S82A/Q143R/Q217V			3.21x 10 ¹	204
Q286M	Q143M	1.07x 10 ¹	47		
Q286L	Q143L	3.20	14		
Q286Y	Q143Y	9.50x 10 ⁻¹	4		
Q366I	Q217I	6.29x 10 ¹	278		
Q366L	Q217L	2.54x 10 ¹	112		
Q366M	Q217M	4.05x 10 ¹	179		
Q286R/K341D	Q143R/K192D	1.80	8		
Q286R/Q366D	Q143R/Q217D	1.00	4		
Q286R/Q366N	Q143R/Q217N	2.75	12		
Q286R/M298Q/Q366D	Q143R/M156Q/Q217D	6.80	30		
Q286R/M298Q/Q366N	Q143R/M156Q/Q217N	2.12x 10 ¹	94		
Q286R/H373F	Q143R/H224F			2.20x 10 ¹	139
Q286R/M298Q/H373F	Q143R/M156Q/H224F	2.16x 10 ²	957	3.17x 10 ²	2009
M298Q/H373F	M156Q/H224F			2.36x 10 ²	1499
M298Q	M156Q	4.59x 10 ²	2029	3.1x 10 ²	1969

Tabla 15. Actividad catalítica de las variantes FVIIa

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Ensayo dependiente de TF						
Mutación (numeración del FVII maduro)	Mutación (numeración de la quimotripsin a)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	SD	%CV	k_{cat}/K_M (% en P)	n
PESO (NovoSeven®)	PESO (NovoSeven®)	3.98E+ 07	1.02E+ 07	26%	106%	30
PESO (NovoSeven- RT®)	PESO (NovoSeven- RT®)	3.48E+ 07	8.33E+ 06	24%	93%	10
PESO	PESO	3.75E+ 07	5.44E+ 06	15%	100%	13
PESO †	PESO†	3.76E+ 07	7.09E+ 06	19%	100%	10
<u>T128N/P129A</u>	T[128]N/P[12 9]A	4.65E+ 07	1.09E+ 07	23%	124%	5
Gla swap FIX	Gla swap FIX	5.38E+ 07	9.08E+ 05	2%	144%	2
K109N	K[109]N	5.54E+ 07	8.57E+ 06	15%	148%	2
A122N/G124S	A[122]N/G[1 24]S	3.87E+ 07	4.96E+ 06	13%	103%	2
S52A/S60A	S[52]A/S[60]A	3.56E+ 07	4.63E+ 06	13%	95%	2
<u>M298Q</u>	M156Q	6.76E+ 07	7.38E+ 06	11%	180%	6
<u>M298Q</u> †	M156Q †	7.46E+ 07	9.42E+ 06	13%	198%	4
<u>T128N/P129A/M 298Q</u> †	T[128]N/P[12 9]A/M156Q †	6.29E+ 07	1.28E+ 07	20%	167%	4
V158D/E296V/ <u>M298Q</u>	V21D/E154V /M156Q	1.81E+ 08	4.43E+ 07	25%	482%	8
V158D/E296V/ <u>M298Q</u> †	V21D/E154V /M156Q †	1.65E+ 08	4.08E+ 07	25%	441%	10
<u>T128N/P129A/V 158D/E296V/M2 98Q</u>	T[128]N/P[12 9]A/V21D/E 154V/M156Q	2.01E+ 08	1.54E+ 07	8%	537%	4
S52A/S60A/V158 D/E296V/M1298 Q	S[52]A/S[60]A /V21D/E154 /M156Q	2.00E+ 08	4.31E+ 05	0%	532%	2
<u>Q286R</u>	Q143R	8.06E+ 07	1.43E+ 07	18%	215%	5
<u>T128N/P129A/Q 286R</u>	T[128]N/P[12 9]A/Q143R	8.45E+ 07	1.90E+ 07	22%	226%	6
<u>T128N/P129A/Q 286R</u> †	T[128]N/P[12 9]A/Q143R †	6.20E+ 07			165%	1
S52A/S60A/ <u>Q28 6R</u>	S[52]A/S[60]A /Q143R	4.10E+ 07	6.71E+ 06	16%	109%	4

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Ensayo dependiente de TF						
Mutación (numeración del FVII maduro)	Mutación (numeración de la quimotripsina)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	SD	%CV	k_{cat}/K_M (% en P)	n
S222A	S82A	4.07E+07	1.17E+07	29%	109%	4
<u>T128N/P129A/S222A</u>	T[128]N/P[129]A/S82A	6.25E+07	6.78E+06	11%	167%	4
S52A/S60A/S222A	S[52]A/S[60]A/S82A	3.91E+07	8.75E+06	22%	104%	3
H257S	H117S	1.18E+08	2.02E+07	17%	316%	2
H373F	H224F	5.58E+07	2.05E+07	37%	149%	2
Q366V	Q217V	5.48E+07	2.69E+06	5%	146%	2
Gla swapFIX/Q366V	Gla swapFIX/Q217V	9.11E+07	2.50E+07	27%	243%	3
A175S	A39S	2.11E+07	6.10E+06	29%	56%	3
K109N/A175S	K[109]N/A39S	1.74E+07	4.29E+06	25%	46%	5
S119N/L121S/A175S	S[119]N/L[121]S/A39S	1.73E+07	1.28E+06	7%	46%	2
<u>T128N/P129A/A175S</u>	T[128]N/P[129]A/A39S	8.59E+06	1.82E+06	21%	23%	2
A122N/G124S/A175S	A[122]N/G[124]S/A39S	1.05E+07	1.12E+06	11%	28%	2
<u>Q286R</u> /H257A	Q143R/H117A	9.91E+07	1.74E+07	18%	264%	2
<u>Q286R</u> /H257A †	Q143R/H117A †	3.08E+07	1.52E+07	49%	82%	4
<u>Q286R</u> /S222A	Q143R/S82A	1.11E+08	3.21E+07	29%	296%	4
Gla swap FIX/ <u>T128N/P129A/S222A/Q286R</u>	Gla swap FIX/T[128]N/P[129]A/S82A/Q143R	1.47E+08	2.53E+07	17%	393%	3
Gla swap FIX/ <u>T128N/P129A/S222A/Q286R</u> †	Gla swap FIX/T[128]N/P[129]A/S82A/Q143R †	1.43E+08	1.63E+07	11%	379%	2
Gla swap FIX/S52A/S60A/S222A	Gla swap FIX/	7.24E+07	2.36E+06	3%	193%	2

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Ensayo dependiente de TF						
Mutación (numeración del FVII maduro)	Mutación (numeración de la quimotripsin a)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	SD	%CV	k_{cat}/K_M (% en P)	n
A/ <u>Q286R</u>	S[52]A/S[60]A /S82A/Q143 R					
<u>Q286R</u> /S222A/H 257A	Q143R/S82A /H117A	6.98E+ 07	1.64E+ 07	23%	186%	3
<u>Q286R</u> / <u>M298Q</u>	Q143R/M156 Q	1.66E+ 08	3.86E+ 07	23%	442%	14
<u>Q286R</u> / <u>M298Q</u> †	Q143R/M156 Q †	1.34E+ 08	2.37E+ 07	18%	356%	15
<u>Q286R</u> / <u>M298Q</u> §	Q143R/M156 Q §	1.54E+ 08	3.86E+ 07	25%	408%	6
Gla swap FIX/ <u>Q286R</u> / <u>M298Q</u>	Gla swap FIX/ Q143R/M156 Q	2.55E+ 08	6.16E+ 07	24%	680%	6
Gla swap FIX/ <u>Q286R</u> / <u>M298Q</u> †	Gla swap FIX/ Q143R/M156 Q †	2.30E+ 08	5.10E+ 07	22%	613%	4
<u>T128N</u> / <u>P129A</u> / <u>Q</u> <u>286R</u> / <u>M298Q</u>	T[128]N/P[12 9]A/Q143R/ M156Q	1.86E+ 08	2.64E+ 07	14%	497%	6
<u>T128N</u> / <u>P129A</u> / <u>Q</u> <u>286R</u> / <u>M298Q</u> †	T[128]N/P[12 9]A/Q143R/ M156Q †	1.50E+ 08	4.16E+ 07	28%	398%	4
Gla swap FIX / <u>T128N</u> / <u>P129A</u> / <u>Q286R</u> / <u>M298Q</u>	Gla swap FIX /T[128]N/P[1 29]A/Q143R/ M156Q	2.11E+ 08	4.41E+ 07	21%	562%	3
Gla swap FIX / <u>T128N</u> / <u>P129A</u> / <u>Q286R</u> / <u>M298Q</u> †	Gla swap FIX /T[128]N/P[1 29]A/Q143R/ M156Q †	1.99E+ 08	6.79E+ 07	34%	529%	5
{Gla swap FIX/E40L}/ <u>Q286R</u> / <u>M298Q</u>	{Gla swap FIX/E[40]L}/ Q143R/M156 Q	2.08E+ 08	4.39E+ 07	21%	556%	4
{Gla swap FIX/K43I}/ <u>Q286R</u> / <u>M298Q</u>	{Gla swap FIX/K[43]I}/ Q143R/M156 Q	2.73E+ 08	5.21E+ 07	19%	727%	5
{Gla swap FIX/K43I}/ <u>Q286R</u> / <u>M298Q</u> †	{Gla swap FIX/K[43]I}/ Q143R/M156	2.91E+ 08	4.30E+ 07	15%	774%	5

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Ensayo dependiente de TF						
Mutación (numeración del FVII maduro)	Mutación (numeración de la quimotripsin a)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	SD	%CV	k_{cat}/K_M (% en P)	n
	Q †					
{Gla swap FIX/Q44S}/ <u>Q286R/M298Q</u>	{Gla swap FIX/Q[44]S}/ Q143R/M156 Q	1.98E+ 08	2.75E+ 07	14%	529%	3
{Gla swap FIX/M19K}/ <u>Q286R/M298Q</u>	{Gla swap FIX/M[19]K} / Q143R/M156 Q	1.41E+ 08	5.22E+ 06	4%	375%	2
S52A/S60A/ <u>Q286R/M298Q</u>	S[52]A/S[60]A /Q143R/M15 6Q	1.25E+ 08	1.14E+ 07	9%	333%	4
Gla swap FIX /S52A/S60A/ <u>Q286R/M298Q</u> †	Gla swap FIX /S[52]A/S[60] A/Q143R/M1 56Q †	1.80E+ 08	1.81E+ 07	10%	480%	3
{Gla swap FIX/M19K/E40L /K43I/Q44S}/ <u>Q286R/M298Q</u>	{Gla swap FIX/M[19]K/ E[40]L/K[43]I /Q[44]}/ Q286R/M298 Q	1.21E+ 08	7.07E+ 06	6%	322%	2
{Gla swap FIX/K43I}/ <u>T128 N/P129A/ Q286R/M298Q</u> †	{Gla swap FIX/K[43]I}/ T128N/P129 A/Q143R/M1 56Q †	2.71E+ 08	6.41E+ 07	24%	720%	5
T239V	T99V	4.64E+ 07	8.38E+ 06	18%	124%	2
T239I	T99I	2.62E+ 07	6.51E+ 06	25%	70%	2
H257A/ <u>M298Q</u>	H117A/Q143 R/M156Q	1.67E+ 07	4.27E+ 06	26%	45%	5
S222A/H257A/ <u>Q 286R/ M298Q</u>	S82A/H117A /Q143R/M15 6Q	1.65E+ 08	1.76E+ 07	11%	440%	4
<u>T128N/P129A/S 222A/ H257A/Q286R/ M298Q</u>	T[128]N/P[12 9]A/S82A/H1 17A/Q143R/ M156Q	1.55E+ 08	5.77E+ 07	37%	414%	9
<u>T128N/P129A/S 222A/ H257A/Q286R/ M298Q</u> †	T[128]N/P[12 9]A/S82A/H1 17A/Q143R/ M156Q †	1.73E+ 08	1.41E+ 07	8%	461%	2

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Ensayo dependiente de TF						
Mutación (numeración del FVII maduro)	Mutación (numeración de la quimotripsin a)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	SD	%CV	k_{cat}/K_M (% en P)	n
S52A/S60A/S222 A/H257A/ Q286 R/M298Q	S[52]A/S[60]A /S82A/H117 A/Q143R/M1 56Q	2.49E+ 08	8.78E+ 06	4%	665%	3
H257S/ Q286R /Q 366V	H117S/Q143 R/Q217V	7.10E+ 07	3.16E+ 07	44%	189%	11
S222A/H257A/ Q 286R / Q366V	S82A/H117A /Q143R/Q21 7V	1.00E+ 08	1.03E+ 07	10%	268%	4
Q286R/M298Q / Q366N	Q143R/M156 Q/Q217N	1.17E+ 08	3.05E+ 07	26%	312%	7
T128N/P129A/Q 286R/M298Q /Q 366N †	T[129]N/P[12 9]A/Q143R/ M156Q/Q217 N †	1.42E+ 08	4.17E+ 07	29%	377%	3
{Gla swap FIX/K43I}/ Q286 R/M298Q /Q366 N †	{Gla swap FIX/K43I}/ Q143R/M156 Q/Q217N †	1.69E+ 08	3.89E+ 07	23%	450%	5
{Gla swap FIX/K43I}/ T128 N/P129A/Q286R /M298Q /Q366N †	{Gla swap FIX/K43I}/T [128]N/P[129] A/Q143R/M1 56Q/Q217N †	2.52E+ 08	1.36E+ 07	5%	669%	2
Q286R /H373F	Q143R/H224 F	9.01E+ 07	7.73E+ 06	9%	240%	2
T128N/P129A/ Q286R /H373F	T[128]N/P[12 9]A/Q143R/ H224F	6.91E+ 07	2.15E+ 07	31%	184%	12
S52A/S60A/ Q286R /H373F	S[52]A/S[60]A /Q143R/H22 4F	9.44E+ 07	1.43E+ 07	15%	252%	3
Q286R/M298Q / H373F	Q143R/M156 Q/H224F	1.36E+ 08	1.92E+ 07	14%	364%	5
T128N/P129A/Q 286R/M298Q /H 373F	T[128]N/P[12 9]A/Q143R/ M156Q/H224 F	1.33E+ 08	4.77E+ 07	36%	354%	17
S52A/S60A/ Q28 6R/M298Q /H37 3F	S[52]A/S[60]A /Q143R/M15 6Q/H224F	1.77E+ 08	3.63E+ 07	21%	472%	3
M298Q /H373F	M156Q/H224 F	7.21E+ 07	1.76E+ 07	24%	192%	4
T128N/P129A/M	T[128]N/P[12	6.07E+	1.29E+	21%	161%	2

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Ensayo dependiente de TF						
Mutación (numeración del FVII maduro)	Mutación (numeración de la quimotripsin a)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	SD	%CV	k_{cat}/K_M (% en P)	n
298Q/H373F †	9]A/M156Q/H224F †	07	07			
V158D/ <u>Q286R</u> /E296V/ <u>M298Q</u>	V21D/Q143R/E154V/M156Q	1.49E+08	3.59E+07	24%	397%	11
S222A/T239V	S82A/T99V	7.49E+07	2.57E+06	3%	200%	3
Gla swap FIX/S222A/T239V/ <u>Q286R</u>	Gla swap FIX/S82A/T99V/Q143R	2.03E+08	3.16E+07	16%	541%	3
Gla swap FIX/S222A/T239V/ <u>Q286R</u> †	Gla swap FIX/S82A/T99V/Q143R †	9.94E+07	1.83E+07	18%	264%	3
T239V/ <u>Q286R</u> / <u>M298Q</u>	T99V/Q143R/M156Q	1.72E+08	4.92E+07	29%	459%	5
Gla swap FIX/T239V/ <u>Q286R</u> / <u>M298Q</u>	Gla swap FIX/T99V/Q143R/M156Q	2.53E+08	4.78E+07	19%	675%	3
Gla swap FIX/T239V/ <u>Q286R</u> / <u>M298Q</u> †	Gla swap FIX/T99V/Q143R/M156Q †	1.79E+08	3.81E+07	21%	477%	4
<u>T128N/P129A</u> /T239V/ <u>Q286R</u> / <u>M298Q</u> †	T[128]N/P[129]A/T99V/Q143R/M156Q †	1.04E+08	2.43E+07	23%	276%	4
S222A/T239V/H257A/ <u>Q286R</u> / <u>M298Q</u>	S82A/T99V/H117A/Q143R/M156Q	2.14E+08	4.48E+07	21%	571%	5
<u>T128N/P129A</u> /S222A/T239V/H257A/ <u>Q286R</u> / <u>M298Q</u> †	T[128]N/P[129]A/S82A/T99V/H117A/Q143R/M156Q †	1.21E+08	5.58E+06	5%	323%	3
T239V/ <u>Q286R</u> /H373F	T99V/Q143R/H224F	1.06E+08	1.34E+07	13%	283%	2
T239V/ <u>Q286R</u> / <u>M298Q</u> /H373F	T99V/Q143R/M156Q/H224F	1.70E+08	1.13E+07	7%	454%	2
<u>T128N/P129A</u> /T239V/ <u>Q286R</u> / <u>M298Q</u> /H373F †	T[128]N/P[129]A/T99V/Q143R/M156Q/H224F †	2.36E+08	2.77E+07	12%	627%	3

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Ensayo dependiente de TF						
Mutación (numeración del FVII maduro)	Mutación (numeración de la quimotripsin a)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	SD	%CV	k_{cat}/K_M (% en P)	n
V158D/T239I/E 296V/ M298Q	V21D/T99I/ E154V/M156 Q	1.45E+ 08	1.18E+ 07	8%	387%	4
T239I/ Q286R	T99I/Q143R	5.79E+ 07	1.39E+ 07	24%	155%	3
S222A/T239I	S82A/T99I	3.05E+ 07	9.26E+ 06	30%	81%	4
GlaSwapFIX/S22 2A/T239I/ Q286 R	Gla swap FIX /S82A/T99I/ Q143R	6.77E+ 07	4.44E+ 06	7%	181%	2
T239I/ Q286R/M 298Q	T99I/Q143R/ M156Q	1.13E+ 08	3.68E+ 06	3%	301%	2
Gla swap FIX / T239I/ Q286R/M 298Q	Gla swap FIX /T99I/Q143R /M156Q	1.25E+ 08	2.13E+ 07	17%	334%	2
T128N/P129A/T 239I/ Q286R/M2 98Q †	T[128]N/P[12 9]A/T99I/Q1 43R/M156Q †	8.17E+ 07	8.17E+ 06	10%	217%	3
S222A/T239I/H2 57A/ Q286R/M2 98Q	S82A/T99I/H 117A/Q143R /M156Q	1.14E+ 08	2.22E+ 07	19%	304%	3
T239I/ Q286R/H 373F	T99I/Q143R/ H224F	6.18E+ 07	9.27E+ 06	15%	165%	3
V158D/T239V/E 296V/ M298Q	V21D/T99V/ E154V/M156 Q	2.22E+ 08	1.39E+ 07	6%	591%	2
V158D/T239V/E 296V/ M298Q †	V21D/T99V/ E154V/M156 Q †	1.65E+ 08	2.12E+ 06	1%	438%	2
T239V/ Q286R	T99V/Q143R	8.84E+ 07	7.16E+ 05	1%	236%	2
T239I/ Q286R/M 298Q/ H237F	T99I/Q143R/ M156Q/H224 F	1.08E+ 08	2.32E+ 07	21%	289%	7
T128N/P129A/T 239I/ Q286R/M2 98Q/ H237F †	T[128]N/P[12 9]A/T99I/Q1 43R/M156Q/ H224F †	1.30E+ 08	2.51E+ 07	19%	345%	5
H257S/ Q286R/ M298Q	H117S/Q143 R/M156Q	1.40E+ 08	8.97E+ 06	6%	372%	4
Gla swap FIX / Q286R/S222A/ H257S	Gla swap FIX /Q143R/S82 A/H117S	8.53E+ 07	1.66E+ 07	20%	227%	3
S222A/H257S/ Q	S82A/H117S/	1.58E+	1.76E+	11%	420%	2

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Ensayo dependiente de TF						
Mutación (numeración del FVII maduro)	Mutación (numeración de la quimotripsin a)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	SD	%CV	k_{cat}/K_M (% en P)	n
<u>286R/ M298Q</u>	Q143R/M156 Q	08	07			
H257S/ <u>Q286R/</u> <u>M298Q/</u> H373F	H117S/Q143 R/M156Q/H 224F	1.52E+ 08	3.35E+ 07	22%	407%	7
S222A/ <u>Q286R/</u> <u>M298Q/</u> H373F	S82A/Q143R /M156Q/H22 4F	1.48E+ 08	2.23E+ 06	2%	395%	2
Gla swap FIX/S222A/ <u>Q286R/M298Q/</u> H373F	Gla swap FIX S82A/Q143R /M156Q/H22 4F	2.84E+ 08	4.85E+ 07	17%	758%	3
S222A/ <u>Q286R/</u> <u>M298Q</u>	S82A/Q143R /M156Q	1.29E+ 08	1.86E+ 07	14%	343%	3
Gla swap FIX/ S222A/ <u>Q286R/</u> <u>M298Q</u>	Gla swap FIX S82A/Q143R /M156Q	2.10E+ 08	4.28E+ 07	20%	559%	5
<u>T128N/P129A/</u> A 175S/ Q366V	T[128]N/P[12 9]A/A39S/Q2 17V	3.38E+ 07	3.06E+ 06	9%	90%	2
A122N/G124S/A 175S/ Q366V	A[122]N/G[1 24]S/A39S/Q 217V	3.02E+ 07	7.05E+ 06	23%	80%	5
T128N/P129A/A 175S/ S222A	T[128]N/P[12 9]A/A39S/S8 2A	1.72E+ 07	3.18E+ 06	18%	46%	3
A122N/G124S/A 175S/ S222A	A[122]N/G[1 24]S/A39S/S8 2A	2.08E+ 07	5.05E+ 06	24%	56%	5
<u>T128N/P129A/</u> A 175S/ <u>Q286R</u>	T[128]N/P[12 9]A/A39S/Q1 43R	3.33E+ 07	1.46E+ 06	4%	89%	3
A122N/G124S/A 175S/ <u>Q286R</u>	A[122]N/G[1 24]S/A39S/Q 143R	4.11E+ 07	5.27E+ 06	13%	110%	5
Gla swap FIX/ S222A/ <u>Q286R/</u> H 373F	Gla swap FIX/ S82A/Q143R /H224F	1.22E+ 08	3.17E+ 07	26%	327%	8
V158D/E296V/ <u>M298Q/</u> H373F	V21D/E154V /M156Q/H22 4F	1.51E+ 08	8.39E+ 06	6%	402%	3
H257A/ <u>Q286R/</u> <u>M298Q</u>	H117A/Q143 R/M156Q	1.13E+ 08	1.55E+ 07	14%	301%	3

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Ensayo dependiente de TF						
Mutación (numeración del FVII maduro)	Mutación (numeración de la quimotripsin a)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	SD	%CV	k_{cat}/K_M (% en P)	n
Gla swap FIX/ T128N/P129A/A 175S/ S222A/ Q286R	Gla swap FIX/ T[128]N/P[12 9]A/A39S/S8 2A/Q143R	3.88E+ 07	2.74E+ 06	7%	104%	3
Gla swap FIX/ A122N/G124S/A 175S/ S222A/ Q286R	Gla swap FIX/ A[122]N/G[1 24]S/A39S/S8 2A/Q143R	4.13E+ 07	8.99E+ 06	22%	110%	6
T128N/P129A/A 175S/ Q286R/M298Q	T[128]N/P[12 9]A/A39S/Q1 43R/M156Q	7.21E+ 07	1.14E+ 07	16%	192%	3
A122N/G124S/A 175S/ Q286R/M298Q	A[122]N/G[1 24]S/A39S/Q 143R/M156Q	7.43E+ 07	1.10E+ 07	15%	198%	3
T128N/P129A/A 175S/ S222A/H257A/ Q 286R/ M298Q	T[128]N/P[12 9]A/A39S/S8 2A/H117A/Q 143R/M156Q	6.89E+ 07	3.36E+ 06	5%	184%	3
A122N/G124S/A 175S/ S222A/H257A/ Q 286R/ M298Q	A[122]N/G[1 24]S/A39S/S8 2A/H117A/Q 143R/M156Q	8.40E+ 07	5.72E+ 06	7%	224%	3
T128N/P129A/A 175S/ Q286R/M298Q/ H373F	T[128]N/P[12 9]A/A39S/Q1 43R/M156Q/ H224F	5.72E+ 07	3.36E+ 06	6%	153%	3
A122N/G124S/A 175S/ Q286R/M298Q/ H373F	A[122]N/G[1 24]S/A39S/Q 143R/M156Q /H224F	8.39E+ 07	9.99E+ 06	12%	224%	3
V158D/ Q286R/ E296V/ M298Q/ H373F	V21D/Q143R /E154V/M15 6Q/H224F	2.39E+ 08	3.82E+ 07	16%	638%	5
M298Q/Q366N/ H373F †	M156Q/Q217 N/H224F †	7.05E+ 07	1.78E+ 07	25%	188%	3
T239V/M298Q/ H373F †	T99V/M156Q /H224F †	4.43E+ 07	1.10E+ 07	25%	118%	3
T239I/M298Q/H 373F †	T99I/M156Q /H224F †	3.47E+ 07	4.57E+ 06	13%	92%	3
T128N/P129A/Q 286R/M298Q/Q	T[128]N/P[12 9]A/Q143R/	1.33E+ 08	1.81E+ 07	14%	355%	2

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Ensayo dependiente de TF						
Mutación (numeración del FVII maduro)	Mutación (numeración de la quimotripsin a)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	SD	%CV	k_{cat}/K_M (% en P)	n
366N/H373F †	M156Q/Q217 N/H224F †					
T239V/ <u>Q286R</u> / <u>M298Q</u> /Q366N †	T99V/Q143R /M156Q/Q21 7N †	1.85E+ 08	5.96E+ 07	32%	491%	4
T239I/ <u>Q286R</u> / <u>M</u> <u>298Q</u> /Q366N †	T99I/Q143R/ M156Q/Q217 N †	7.40E+ 07	1.40E+ 07	19%	197%	4
TF-independent assay						
Mutation (mature FVII numbering)	Mutation (Chymotrypsi n numbering)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	SD	%C V	k_{cat}/K_M (% PESO)	n
PESO (NovoSeven®)	PESO (NovoSeven®)	9.8	3.0	30%	88%	14
PESO (NovoSeven- RT®)	PESO (NovoSeven- RT®)	12.4	4.3	35%	112%	12
PESO	PESO	11.1	2.7	25%	100%	5
PESO †	PESO †	6.9	2.2	31%	100%	7
T128N/P129A	T[128]N/P[12 9]A	17.0	5.2	31%	153%	3
Gla swap FIX	Gla swap FIX	41.3	3.0	7%	373%	2
A122N/G124S	A[122]N/G[1 24]S	3.4	0.6	16%	31%	2
S52A/S60A	S[52]A/S[60]A	3.8			34%	1
M298Q †	M156Q †	69.9	49.4	71%	1013%	3
T128N/P129A/M 156Q †	T[128]N/P[12 9]A/M156Q †	90.8	70.8	78%	1316%	5
V158D/E296V/ M298Q	V21D/E154V /M156Q	1221.7	307.0	25%	11025%	4
V158D/E296V/ M298Q †	V21D/E154V /M156Q †	984.5	308.4	31%	14265%	2
<u>T128N</u> / <u>P129A</u> /V 158D/E296V/ <u>M2</u> <u>98Q</u>	T[128]N/P[12 9]A/V21D/E 154V/M156Q	1375.8	140.3	10%	12415%	3
S52A/S60A/V158 D/E296V/M1298 Q	S[52]A/S[60]A /V21D/E154 V/M156Q	1760.1	575.0	33%	15883%	3
Q286R	Q143R	10.3	0.7	7%	93%	3
<u>T128N</u> / <u>P129A</u> / <u>Q</u> <u>286R</u>	T[128]N/P[12 9]A/Q143R	8.7	4.3	50%	78%	5
<u>T128N</u> / <u>P129A</u> / <u>Q</u> <u>286R</u> †	T[128]N/P[12 9]A/Q143R †	10.5	5.6	53%	152%	6

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Ensayo dependiente de TF						
Mutación (numeración del FVII maduro)	Mutación (numeración de la quimotripsin a)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	SD	%CV	k_{cat}/K_M (% en P)	n
S52A/S60A/S82A	S[52]A/S[60]A /S82A	10.2	4.7	47%	92%	3
T128N/P129A/S 222A	T[128]N/P[12 9]A/S82A	4.8			43%	1
S52A/S60A/S222 A	S[52]A/S[60]A /S82A	19.6			177%	1
H257S	H117S	3.1	1.1	35%	28%	7
Q366V	Q217V	4.3	0.6	14%	39%	2
Gla swapFIX/Q366V	Gla swapFIX/Q21 7V	90.0	17.7	20%	812%	2
Q286R/H257A	Q143R/H117 A	4.3	2.1	49%	39%	3
Q286R/H257A †	Q143R/H117 A †	2.5	0.0	0%	36%	2
Gla swap FIX/ <u>T128N/P129A/</u> S222A/ <u>Q286R</u>	Gla swap FIX/ T[128]N/P[12 9]A/ S82A/Q143R	15.5	2.9	18%	140%	4
Gla swap FIX/ <u>T128N/P129A/</u> S222A/ <u>Q286R</u> †	Gla swap FIX/ T[128]N/P[12 9]A/ S82A/Q143R †	21.3	6.5	31%	309%	5
Gla swap FIX/ S52A/S60A/S222 A/ <u>Q286R</u>	Gla swap FIX/ S[52]A/S[60]A /S82A/Q143 R	2.9			26%	1
<u>Q286R</u> /S222A/H 257A	Q143R/S82A /H117A	21.3	6.5	31%	193%	5
<u>Q286R</u> / <u>M298Q</u>	Q143R/M156 Q	79.9	18.9	24%	721%	5
<u>Q286R</u> / <u>M298Q</u> †	Q143R/M156 Q †	162.4	79.9	49%	2353%	12
<u>Q286R</u> / <u>M298Q</u> §	Q143R/M156 Q §	135.1	7.3	5%	1957%	2
Gla swap FIX/ <u>Q286R</u> / <u>M298Q</u>	Gla swap FIX/ Q143R/M156 Q	672.7	79.1	12%	6070%	4
Gla swap FIX/	Gla swap	678.2	249.0	37%	9826%	11

Clarke, Modet & C°

COLOMBIA

Ensayo dependiente de TF							
Mutación (numeración del FVII maduro)	Mutación (numeración de la quimotripsin a)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	SD	%CV		k_{cat}/K ^M (% en P)	n
<u>Q286R/M298Q</u> †	FIX/ Q143R/M156 Q †						
<u>T128N/P129A/Q 286R/ M298Q</u>	T[128]N/P[12 9]A/Q143R/ M156Q	81.6	13.4	16%	736%	4	
<u>T128N/P129A/Q 286R/ M298Q</u> †	T[128]N/P[12 9]A/Q143R/ M156Q †	212.5	135.4	64%	3079%	10	
Gla swap FIX / <u>T128N/P129A/ Q286R/ M298Q</u>	Gla swap FIX /T[128]N/P[1 29]A/Q143R/ M156Q	83.8	35.3	42%	756%	6	
Gla swap FIX / <u>T128N/P129A/ Q286R/ M298Q</u> †	Gla swap FIX /T[128]N/P[1 29]A/Q143R/ M156Q †	751.9	305.3	41%	10895%	6	
{Gla swap FIX/E40L}/ <u>Q286R/M298Q</u>	{Gla swap FIX/E[40]L}/ Q143R/M156 Q	814.1	89.0	11%	7346%	2	
{Gla swap FIX/K43I}/ <u>Q286R/M298Q</u>	{Gla swap FIX/K[43]I}/ Q143R/M156 Q	902.4	360.6	40%	8144%	11	
{Gla swap FIX/K43I}/ <u>Q286R/M298Q</u> †	{Gla swap FIX/K[43]I}/ Q143R/M156 Q †	794.2	178.7	23%	11508%	6	
{Gla swap FIX/Q44S}/ <u>Q286R/M298Q</u>	{Gla swap FIX/Q[44]S}/ Q143R/M156 Q	729.0	4.5	1%	6578%	2	
{Gla swap FIX/M19K}/ <u>Q286R/M298Q</u>	{Gla swap FIX/M[19]K} / Q143R/M156 Q	512.0	51.4	10%	4620%	2	
S52A/S60A/ <u>Q286R/M298Q</u>	S[52]A/S[60]A /Q143R/M15 6Q	216.8	1.6	1%	1956%	2	
Gla swap FIX /S52A/S60A/ <u>Q286R/M298Q</u>	Gla swap FIX/S[52]A/ S[60]A/Q143 R/M156Q	988.7	207.5	21%	14327%	2	

Clarke, Modet & C°

COLOMBIA

Ensayo dependiente de TF						
Mutación (numeración del FVII maduro)	Mutación (numeración de la quimotripsin a)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	SD	%CV	k_{cat}/K_M (% en P)	n
{Gla swap FIX/K43I} / <u>T128N/P129A</u> / <u>Q286R/M298Q</u> †	{Gla swap FIX/K[43]I}/ T[128]N/P[12 9]A/ Q143R/M156 Q †	389.4	34.3	9%	5642%	2
S222A/H257A/ <u>Q286R</u> / <u>M298Q</u>	S82A/H117A /Q143R/M15 6Q	345.3	99.9	29%	3116%	3
<u>T128N/P129A</u> /S 222A/ H257A/ <u>Q286R</u> / <u>M298Q</u>	T[128]N/P[12 9]A/S82A/H1 17A/Q143R/ M156Q	24.8	17.2	69%	224%	4
<u>T128N/P129A</u> /S 222A/ H257A/ <u>Q286R</u> / <u>M298Q</u> †	T[128]N/P[12 9]A/S82A/H1 17A/Q143R/ M156Q †	82.6	40.2	49%	1196%	3
S52A/S60A/S222 A/H257A/ <u>Q286R</u> / <u>M298Q</u>	S[52]A/S[60]A /S82A/H117 A/Q143R/M1 56Q	115.6	62.9	54%	1043%	2
H257S/Q286R/Q 366V	H117S/Q143 R/Q217V	7.7	1.8	23%	69%	2
S222A/H257A/Q 286R/Q366V	S82A/H117A /Q143R/Q21 7V	12.5	2.8	23%	113%	2
<u>Q286R/M298Q</u> / Q366N	Q143R/M156 Q/Q217N	65.9	33.4	51%	595%	5
T129N/ <u>P129A</u> / <u>Q286R</u> / <u>M298Q</u> /Q 366N †	T[129]N/P[12 9]A/Q143R/ M156Q/Q217 N †	64.6	28.7	44%	936%	4
{Gla swap FIX/K43I} / <u>Q286R/M298Q</u> /Q217N †	{Gla swap FIX/K[43]I} /Q143R/M15 6Q/Q217N †	84.9	76.5	90%	1230%	4
{Gla swap FIX/K43I} / <u>T128N/P129A</u> / <u>Q286R/M298Q</u> / Q366N †	{Gla swap FIX/K[43]I} /T[128]N/P[1 29]A/Q143R/ M156Q/Q217 N †	218.5	137.8	63%	3166%	3
Q286R/H373F	Q143R/H224 F	81.6	123.7	152 %	736%	9
T128N/P129A/	T[128]N/P[12	6.6	0.9	13%	59%	2

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Ensayo dependiente de TF						
Mutación (numeración del FVII maduro)	Mutación (numeración de la quimotripsin a)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	SD	%CV	k_{cat}/K_M (% en P)	n
Q286R/H373F	9]A/Q143R/ H224F					
S52A/S60A/ Q286R /H373F	S[52]A/S[60]A/ Q143R/H224F	30.1			272%	1
Q286R/M298Q /H373F	Q143R/M156Q/H224F	114.8	24.7	22%	1036%	5
T128N/P129A/Q286R/M298Q /H373F †	T[128]N/P[129]A/Q143R/M156Q/H224F †	30.7	8.9	29%	277%	4
S52A/S60A/ Q286R/M298Q /H373F	S[52]A/S[60]A/Q143R/M156Q/H224F	63.3	10.8	17%	571%	3
M298Q /H373F	M156Q/H224F	96.4	47.0	49%	870%	5
T128N/P129A/M298Q /H373F	T[128]N/P[129]A/M156Q/H224F	91.6	48.0	52%	1327%	3
V158D/ Q286R /E296V/ M298Q	V21D/Q143R/E154V/M156Q	1023.9	339.3	33%	9240%	5
S222A/T239V	S82A/T99V	3.0			27%	1
Gla swap FIX/ S222A/T239V/ Q286R	Gla swap FIX/ S82A/T99V/ Q143R	17.4	2.2	13%	157%	3
Gla swap FIX/ S222A/T239V/ Q286R †	Gla swap FIX/ S82A/T99V/ Q143R †	87.9	61.7	70%	1274%	4
T239V/ Q286R/M298Q	T99V/Q143R/M156Q	29.3	6.2	21%	264%	4
Gla swap FIX/ T239V/ Q286R/M298Q	Gla swap FIX/ T99V/Q143R/M156Q	277.7	64.2	23%	2506%	3
Gla swap FIX/ T239V/ Q286R/M298Q †	Gla swap FIX/ T99V/Q143R/M156Q †	902.4	323.5	36%	13076%	6
T128N/P129A/T239V/Q286R/M298Q †	T[128]N/P[129]A/T99V/Q143R/M156Q †	229.7	134.1	58%	3329%	5
S222A/T239V/H	S82A/T99V/	143.0	93.1	65%	1290%	10

Clarke, Modet & Cº

COLOMBIA

Ensayo dependiente de TF						
Mutación (numeración del FVII maduro)	Mutación (numeración de la quimotripsin a)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	SD	%CV	k_{cat}/K_M (% en P)	n
257A/ Q286R/M298Q	H117A/Q143 R/M156Q					
T128N/P129A / S222A/T239V/H 257A/ Q286R/M298Q	T[128]N/P[12 9]A/ S82A/T99V/ H117A/Q143 R/M156Q	179.0	80.5	45%	2593%	5
T239V/ Q286R / H373F	T99V/Q143R /H224F	12.2			110%	1
T239V/ Q286R / M298Q /H373F	T99V/Q143R /M156Q/H22 4F	40.7	5.2	13%	367%	2
T128N/P129A /T 99V/Q143R/M15 6Q/H224F	T[128]N/P129]A/T99V/Q1 43R/M156Q/ H224F	290.0	72.9	25%	4203%	4
V158D/T239I/E 296V/M298Q	V21D/T99I/ E154V/M156 Q	216.3	32.5	15%	1951%	2
T239I/Q286R	T99I/Q143R	4.6	1.3	28%	41%	4
S222A/T239I	S82A/T99I	1.7			15%	1
Gla swap FIX /S222A/T239I/Q 286R	Gla swap FIX /S82A/T99I/ Q143R	20.3			184%	1
T239I/ Q286R/M 298Q	T99I/Q143R/ M156Q	11.3	4.0	35%	102%	4
Gla swap FIX / T239I/ Q286R/M 298Q	Gla swap FIX /T99I/Q143R /M156Q	244.0	9.6	4%	2202%	2
T128N/P129A /T 239I/ Q286R/M2 98Q	T[128]N/P129]A/T99I/Q14 3R/M156Q	77.8	40.3	52%	1128%	5
S222A/T239I/H2 57A/ Q286R/M2 98Q	S82A/T99I/H 117A/Q143R /M156Q	51.6	5.7	11%	466%	2
V158D/T239V/E 296V/M298Q	V21D/T99V/ E154V/M156 Q	1864.3	374.0	20%	16823%	2
V158D/T239V/E 296V/M298Q†	V21D/T99V/ E154V/M156 Q†	4231.6	913.4	22%	61315%	4
T239V/Q286R	T99V/Q143R	11.8	4.1	35%	106%	4
T239I/ Q286R/M 298Q /H373F	T99I/Q143R/ M156Q/H224	13.1	3.8	29%	118%	3

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Ensayo dependiente de TF						
Mutación (numeración del FVII maduro)	Mutación (numeración de la quimotripsin a)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	SD	%CV	k_{cat}/K_M (% en P)	n
	F					
<u>T128N/P129A/T239I/Q286R/M298Q</u> /H373F †	T[128]N/P[129]A/T99I/Q143R/M156Q/H224F †	113.3	43.7	39%	1642%	5
H257S/ <u>Q286R/M298Q</u>	H117S/Q143R/M156Q	27.4	4.1	15%	247%	4
Gla swap FIX/S222A/H257S/Q143R	Gla swap FIX/S82A/H117S/Q143R	20.5	3.6	18%	185%	2
S222A/ <u>Q286R/M298Q</u> / H373F	S82A/Q143R/M156Q/H224F	41.7	9.1	22%	376%	4
H257S/ <u>Q286R/M298Q</u> /H373F	H117S/Q143R/M156Q/H224F	30.4	9.1	30%	274%	3
S82A/Q143R/M156Q/H224F	S82A/Q143R/M156Q/H224F	430.2	126.8	29%	3883%	3
Gla swap FIX/S222A/ <u>Q286R/M298Q</u> /H373F	Gla swap FIX/S82A/Q143R/M156Q/H224F	192.1	36.8	19%	1733%	2
S222A/ <u>Q286R/M298Q</u>	S82A/Q143R/M156Q	252.9	7.4	3%	2282%	2
Gla swap FIX/S222A/ <u>Q286R/M298Q</u>	Gla swap FIX/S82A/Q143R/M156Q	414.7	81.3	20%	3742%	2
T128N/P129A/A175S/Q366V	T[128]N/P[129]A/A39S/Q217V	3.4	1.0	29%	30%	2
A122N/G124S/A175S/Q366V	A[122]N/G[124]S/A39S/Q217V	3.0	0.8	26%	27%	4
T128N/P129A/A175S/S222A	T[128]N/P[129]A/A39S/S82A	1.9	0.5	26%	17%	2
T128N/P129A/A175S/Q286R	T[128]N/P[129]A/A39S/Q143R	3.3	1.2	37%	29%	4
A122N/G124S/A175S/	A[122]N/G[124]S/A39S/Q	3.0	0.7	23%	27%	2

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Ensayo dependiente de TF						
Mutación (numeración del FVII maduro)	Mutación (numeración de la quimotripsin a)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	SD	%CV	k_{cat}/K_M (% en P)	n
Q286R	143R					
Gla swap FIX/ S222A/Q286R/H 373F	Gla swap FIX/ S82A/Q143R /H224F	81.2	66.7	82%	732%	2
V158D/E296V/ M298Q/H373F	V21D/E154V /M156Q/H22 4F	1297.2	486.1	37%	11706%	4
H257A/ Q286R / M298Q	H117A/Q143 R/M156Q	61.5	43.8	71%	555%	2
Gla swap FIX/ T128N/P129A /A 175S/S222A/ Q286R	Gla swap FIX/ T[128]N/P[12 9]A/A39S/S8 2A/Q143R	30.5			276%	1
T128N/P129A /A 175S/ S222A/H257A/ Q286R / M298Q	T[128]N/P[12 9]A/A39S/S8 2A/H117A/Q 143R/M156Q	20.3	3.8	19%	183%	2
V158D/ Q286R / E296V/ M298Q / H373F	V21D/Q143R /E154V/M15 6Q/H224F	573.6	100.4	18%	5176%	6
M298Q /Q366N/ H373F †	M156Q/Q217 N/H224F †	125.9	75.2	60%	1825%	4
T239V/ M298Q / H373F †	T99V/M156Q /H224F †	319.5	125.0	39%	4629%	6
T239I/ M298Q /H 373F †	T99I/M156Q /H224F †	138.2	101.9	74%	2003%	7
T128N/P129A/Q286R/M298Q /Q 366N/H373F †	T[128]N/P[12 9]A/Q143R/ M156Q/Q217 N/H224F †	160.9	43.3	27%	2331%	4
T239V/ Q286R / M298Q /Q366N †	T99V/Q143R /M156Q/Q21 7N †	64.2	36.3	57%	931%	3
T239I/ Q286R/M298Q /Q366N †	T99I/Q143R/ M156Q/Q217 N †	88.8	23.5	26%	1287%	5

† producidos en células CHOx
§ producidos en el clon 52-5F7 de la línea celular estable CHOx

Estos datos muestran que los polipéptidos que contienen mutaciones además de 286R/298Q exhiben actividad incrementada. La adición de mutaciones en 128 y 129 no impacta sobre la actividad. Ver, por ejemplo, Tabla 24, porciones

Clarke, Modet & Cº

COLOMBIA

ilustrativas se reproducen como sigue:

Mutación (numeración FVII maduro)	% Recuperación (in vivo)	Actividad AUC*/Dosis (Dependiente de TF)	Mejora en la exposición de la actividad sobre Novo7 (Dependiente de TF)	Actividad AUC*/Dosis (Independiente de TF)	Mejora en la exposición de la actividad sobre Novo7 (Independiente de TF)
NovoSeven® FVIIa	60%	2.95E+10	1.0	7.26E+03	1.0
Peso	46%	4.71E+10	1.4	1.22E+04	1.5
T[128]N/P[129]A / Q286R/M298Q	66%	1.55E+11	5.3	2.20E+05	30.3
T[128]N/P[129]A / Q286R/M298Q	62%	4.21E+11	14.4	1.84E+05	25.4
Q286R/M298Q/ Gla swap FIX	21%	8.53E+10	2.7	2.30E+05	29.9
Q286R/M298Q	51%	1.08E+11	3.2	1.03E+05	11.2

Estos datos muestran que, en contraste con las enseñanzas de D1 que 286R es perjudicial para la actividad, la mutación 286R, incrementa la actividad FVII significativamente, sin requerir de mutaciones compensatorias. Ni D1 ni D2 ni cualquier arte previo del cual la Solicitante esté consiente describe o sugiere tales resultados. Por lo tanto, en vista de los resultados logrados por la mutación 286R, sola, y en combinación con otras mutaciones, los polipéptidos reivindicados en la presente son inventivos frente a D1 y D2, al igual que a los otros artes previos de los cuales la Solicitante está consiente. Ninguno de los artes previos enseña o sugiere que la mutación 286R, no solo no es perjudicial, sino que confiere una actividad de coagulación incrementada.

Así las cosas, nos permitimos ratificar que ni D1 ni D2 suministra indicio o sugerencia alguna de que Q2876R incrementa la actividad coagulante. Como se discutió y mostró en detalle antes (cada mención de Q286 en D2 está determinada), D2 nunca cita Q286R (y no se esperaría que lo hiciera, ya que al menos un inventor de D2 considera que Q286R es perjudicial como se estableció en D1). D2 solamente prueba específicamente Q286A. El Ejemplo 7 en D2 Ostergaard et al., describe el mutante Q286A y muestra que tiene cerca de un 93% de actividad amidolítica en comparación con el FVII tipo silvestre, 83% de activación de FX en comparación con el FVII tipo silvestre y cerca de 77% de inhibición ATIII en comparación con el tipo silvestre. La Figura 2 en D2 resume estos datos con respecto a los mutantes e identifica los mutantes promisorios (círculos coloreados). Q286A es ilustrado, pero no se le identifica como un mutante promisorio, ya que exhibe actividades relativamente bajas y no una

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

disminución significativa en la inhibición de ATIII.

Así la sola mutación específica (aparte de la recitación general de que Q286 puede ser remplazado con cualquier aminoácido) en 286 que es enseñada es la Q286A. Así, no existe absolutamente ninguna motivación en D1 y/o D2 para preparar cualquier polipéptido con la mutación Q286R sola o con hasta 6 otras mutaciones como se menciona en la reivindicación 1 ni da sugerencia alguna sobre los resultados excepcionales logrados. Los datos en los Ejemplos, incluyendo las Tablas 14 – 20 dan evidencia de esto. Nuevamente, como ya se estableció repetidamente antes, ninguno de los artes previos citados, ni ningún registro en la técnica ha sugerido estos resultados.

En conclusión, nos permitimos decir que la combinación de la divulgación en la especificación, incluyendo la divulgación de las secuencias completas de los numerosos polipéptidos FVII ilustrativos, y los métodos para ensayar la actividad, y las bien caracterizadas relaciones estructura/función de los polipéptidos FVII evidencian que la solicitud soporta las reivindicaciones para un polipéptido FVII que comprende las mutaciones **286R solas y en combinación con modificaciones adicionales.**

Adicionalmente y como se discutió antes, la memoria descriptiva suministra más de 200 polipéptidos FVII ejemplares y las presentes reivindicaciones requieren de mutaciones particulares. La descripción también suministra ensayos ejemplares en los cuales se ensaya la actividad procoagulante de los polipéptidos. La especificación también enseña que estas técnicas eran bien conocidas en la técnica. Si es necesario, una persona versada en la técnica podría ensayar los polipéptidos en cuanto la actividad procoagulante usando los ensayos suministrados o conocidos por ellos o para revisar las secuencias para determinar cuáles poseen los requisitos catalíticos ensayados para identificar aquellos que poseen actividad catalítica.

En este sentido y de manera respetuosa, nos permitimos ratificar que la solicitante no “inventó” el polipéptido FVII, sino que suministra mutaciones particulares que no fueron apreciadas hasta ahora y que mejoran las propiedades de los polipéptidos FVII; estas mutaciones pueden ser combinadas con otras mutaciones como describió y fueron ejemplificadas en la solicitud, y también con mutaciones conocidas para aquellos versados en la técnica. La especificación, acoplada con el conocimiento de la técnica, describe los dominios y residuos del FVII requeridos para una actividad procoagulante suficiente para correlacionar la estructura y funciones del polipéptido, y también describe otras modificaciones existentes conocidas en la técnica que también tienen una estructura y función correlacionadas con numerosas otras actividades conocidas en la técnica del FVII.

En vista de lo anterior, nos permitimos decir que las reivindicaciones ahora

Clarke, Modet & Cº

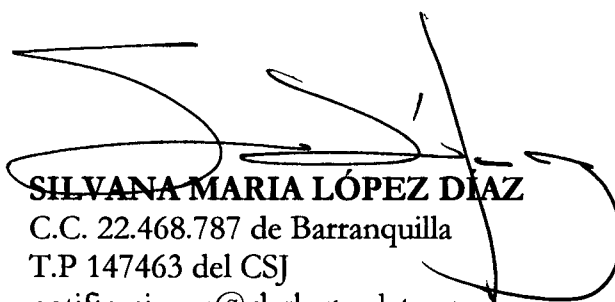
COLOMBIA

modificadas son patentables sobre los documentos D1 y D2 si se consideran por separado o en combinación. Las reivindicaciones dependientes son patentables al menos por las mismas razones.

Habiendo atendido cabalmente las objeciones presentadas por ese despacho, atentamente solicitamos se conceda el privilegio de patente de invención a la solicitud en estudio y a la solicitud divisional ahora presentada o si el señor examinador considera que subsisten razones para objetar la presente invención, rogamos expedir otro examen de fondo con los debidos motivos y razones que sustenten su objeción con el fin de que nuestro mandante tenga la posibilidad de exponer sus argumentos con base en la interpretación de los artículos 45 de la Decisión 486 -el cual otorga la facultad al examinador para emitir los exámenes de fondo-, 35 y 59 del Código Contencioso Administrativo que señala que: *“habiéndose dado oportunidad a los interesados para expresar sus opiniones, y con base en las pruebas e informes disponibles, se tomará la decisión que será motivada al menos en forma sumaria si afecta a particulares”* y *“(.) deberá proferirse la decisión definitiva. Esta se motivará en sus aspectos de hecho y de derecho, y en los de conveniencia si es el caso”,* respectivamente (El subrayado es nuestro).

En consecuencia, solicitamos a ese despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional

Señor Superintendente,



SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ

C.C. 22.468.787 de Barranquilla

T.P 147463 del CSJ

notificaciones@clarkemodet.com.co

REIVINDICACIONES

5 1. Un polipéptido del factor VII (FVII) modificado, en el que

El polipéptido FVII tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 remplazos de aminoácidos comparado con un polipéptido FVII no modificado que comprende las secuencias de aminoácidos establecidas en cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-3 y 18-74;

10 Un remplazo de aminoácidos está en la posición que corresponden a la posición 286 en un polipéptido del FVII que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO 3; y

la modificación en la posición 286 es un reemplazo por una arginina (Arg, R);

15 Las posiciones correspondientes en las SEQ ID NOS: 2, 3 y 18-74 se determinan por alineación con el polipéptido de la SEQ ID NO: 3; y

El remplazo de aminoácidos adicional es seleccionado de entre D196K, D196R, D196A, D196Y, D196F, D196W, D196L, D196I, K197Y, K197A, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197F, K197W, K199A, K199D, K199E, 20 G237W, G237T, G237I, G237V, T239A, R290A, R290E, R290D, R290N, R290Q, R290K, R290M, R290V, K341E, K341R, K341N, K341M, K341D, T239S, T239N, T239Q, T239V, T239L, T239H, T239I, L287T, P321K, P321E, P321Y, P321S, Q366D, Q366E, Q366N, Q366T, Q366S, Q366V, Q366I, Q366L, Q366M, H373D, H373E, H373S, H373L, H373I, H373F, H373A, K161S, K161A, K161V, H216S, 25 H216A, H216K, H216R, S222A, S222K, S222V, S222N, S222E, S222D, H257A, H257S, S52A, S60A, E394N, P395A, R396S, R202S, A292N, A294S, G318N, A175S, K109N, A122N, G124S, A51N, T130N, E132S, S52N

46

2. El polipéptido FVII modificado de la reivindicación , que es un polipéptido FVII activado.

3. El polipéptido FVII modificado de la reivindicación 1 o 2, en donde
5 el polipéptido FVII no modificado comprende la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NOS: 1-3.

4. El polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que comprende remplazos de aminoácidos seleccionados
10 entre Q286R, Q286R/H257A, Q286R/S222A, Q286R/S222A/H257A, Q286R/S222A/Gla Intercambio FIX, Q286R/H257A/Gla Intercambio FIX, Q286R/S222A/H257A/Gla Intercambio FIX, Q286R/Q366V, Q286R/A292N/A294S/Q366V, A175S/Q286R/Q366V, S222A/Q286R/Q366V, H257S/Q286R, H257S/Q286R/Q366V, S222A/H257A/Q286R/Q366V,
15 Q286R/H373A, S222A/H257A/Q286R/M158Q, Q286R/K341D, Q286R/Q366D, Q286R/Q366N, Q286R/H373F, T128N/P129A/Q286R, T128N/P129A/Q286R/H373F, S52A/S60A/Q286R, S52A/S60A/Q286R/H373F/, T239V/Q286R, T239V/Q286R/H373F, T128N/P129A/A175S/Q286R,
20 A122N/G124S/A175S/Q286R.

5. El polipéptido FVII modificado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende modificaciones pos-translacionales.

25 6. El polipéptido FVII modificado de la reivindicación 5, en donde las modificaciones pos-translacionales comprenden glicosilación.

47

7. El polipéptido FVII modificado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que es un polipéptido FVIIa activado de dos cadenas.

8. El polipéptido FVII modificado según cualquiera de las
5 reivindicaciones 1 a 6 que es un polipéptido maduro.

9. El polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que es un polipéptido de cadena única o un polipéptido de dos cadenas.

10 10. El polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que tiene solamente tres remplazos de aminoácidos además del remplazo Q286R comparado con el polipéptido de una de las SEQ ID NOS: 1-3.

11. Una composición farmacéutica, que comprende una concentración o
15 una cantidad efectiva terapéuticamente de un polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en un vehículo aceptable farmacéuticamente.

12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11 que se formula
20 para la administración en una sola dosis.

13. La composición farmacéutica de la reivindicación 11 o la reivindicación 12 que se formula para administración oral, nasal, pulmonar, bucal, transdérmica, subcutánea, intraduodenal, enteral, parenteral, intravenosa o intramuscular.

25

14. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 que es liofilizada.

48