Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

P- 2021/16671

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
E. S. D.

Re: Expediente No. **NC2021/0008338**
Solicitud de patente a nombre de **VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED**

Yo, CAROLINA DAZA MONTALVO identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, obrando como apoderada de la sociedad VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED., domiciliada en Massachusetts, Estados Unidos de América, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. **2167** notificado electrónicamente el 7 de febrero de 2024, relacionado con los requerimientos de fondo de la solicitud, y para el cual oportunamente solicité prórroga el 2 de mayo de 2024, atentamente me permito presentar la siguiente información:

1. **Título**

El examinador afirma que el título de la invención "POLIPÉPTIDOS DE ACTIVADOR DE PLASMINÓGENO, TIPO UROCINASA, MODIFICADOS Y MÉTODOS DE USO" no se relaciona con el objeto de la solicitud contenida en las reivindicaciones.

Para superar la objeción, el título se modifica de acuerdo con la sugerencia del examinador: "POLIPÉPTIDOS ACTIVADORES DEL PLASMINÓGENO DE TIPO UROQUINASA MODIFICADOS Y COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN LOS POLIPÉPTIDOS MODIFICADOS".

2. **Modificación al capítulo reivindicatorio:**

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,

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

presento junto a este memorial un nuevo capítulo reivindicatorio que consta de ciento dos (102) reivindicaciones, el cual reemplaza completamente el documento presentado el 28 de abril de 2022. Específicamente, se realizaron las siguientes modificaciones:

2.1 Se modificó la reivindicación 1 con el fin de:

2.1.1 Reemplazar el término "urocinasa" por "uroquinasa".

2.1.2 Incluir la aclaración de que de que la modificación al polipéptido u-PA comprende la modificación V41R y hasta 17 modificaciones adicionales. Dicha aclaración se sustenta en las páginas 8 a 10 y 17 de la descripción como fue originalmente presentada.

2.1.3 Remplazar el término "comprende" por "consiste en" para referirse a que el polipéptido u-PA no modificado consiste en cualquiera de las SEQ ID NO:1-6.

2.1.4 Reestructurar la reivindicación eliminando las expresiones "en comparación con el polipéptido de u-PA no modificado que no contiene las modificaciones de aminoácidos" y "la proteína de complemento es C3".

2.1.5 Incluir la aclaración de que la porción catalíticamente activa del polipéptido de SEQ ID NO: 1, 3, 4 y 6 que contiene el dominio de proteasa expuesto en SEQ ID NO: 2 o 5. Dicha aclaración se sustenta en las páginas 35, 51 y 100 de la descripción.

2.1.6 Incluir el conjunto de modificaciones adicionales específicas del polipéptido de conformidad con la Tabla 14 de la descripción y la antigua reivindicación 33.

2.1.7 Mencionar la posibilidad de que los polipéptidos no incluyan la modificación C122S, y, por tanto, en la posición 122 esté presente una C, de conformidad con la página 61 de la descripción.

2.2 Se eliminaron las reivindicaciones 2 a 4, 7 a 23, 28 a 39 y 41 a 43. Además, se ajustó la numeración y las dependencias en el documento.

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

2.3 Se modificó las antiguas reivindicaciones 5 y 45 a 47 (nueva reivindicación 2 y 10 a 12 respectivamente), con el fin de reemplazar "consiste de" por "consiste en".

2.4 Ser modificó la dependencia de la antigua reivindicación 6 (nueva reivindicación 3), de modo que solo dependa de la reivindicación 1.

2.5 Se modificó la antigua reivindicación 24 (nueva reivindicación 4) con el fin de eliminar la referencia a que el ED_{50} del polipéptido u-PA tiene valores de "50nm, 30nM o 25 nM".

2.6 Se modificó la antigua reivindicación 25 (nueva reivindicación 5) con el fin de:

2.6.1 Remplazar la referencia a la Tabla 14 de la descripción por el grupo de modificaciones al polipéptido a los que hacía referencia.

2.6.2 Mencionar la posibilidad de que los polipéptidos no incluyan la modificación C122S, y, por tanto, en la posición 122 esté presente una C, de conformidad con la página 61 de la descripción.

2.7 Se modificó la antigua reivindicación 40 (nueva reivindicación 8), con el fin de:

2.7.1 Modificar la redacción de manera que sea claro que las modificaciones allí indicadas se realizan en el polipéptido u-PA.

2.7.2 Eliminar el grupo de modificaciones "Y40Q/V41L/L97bA/C122S" y "Y40Q/V41L/L97bA".

2.8 Se modificó la antigua reivindicación 48 (nueva reivindicación 13), con el fin de:

2.8.1 Modificar la dependencia, de manera que ahora solo dependa de la reivindicación independiente 1.

2.8.2 Mejorar su redacción de manera que sea claro que las modificaciones de aminoácidos son seleccionadas de entre el grupo de modificaciones presentado con numeración de quimotripsina.

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

2.8.3 Eliminar los grupos de modificaciones "R35Q/H37Y/R37aE/V38E/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;", "R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;", "R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/H99Q/C122S/Y149R" y "R35Q/H37T/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aE/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;".

2.9 Se modificó la antigua reivindicación 50 (nueva reivindicación 15), con el fin de:

2.9.1 Restringir las secuencias de los polipéptidos u-PA modificados SEQ ID NO: 8 a 44, de manera que ahora haga referencia a las SEQ ID NO: 8-15, 18-25, 28-30, 32-40, 42-44.

2.9.2 Restringir las secuencias de los polipéptidos u-PA modificados SEQ ID NO: 977 a 987, de manera que ahora haga referencia a las SEQ ID NO: 977 a 986.

2.10 Se modificó la antigua reivindicación 57 (nueva reivindicación 22), con el fin de aclarar el polipéptido u-PA modificado escinde los residuos QHARASHLG entre R y A. Dicha modificación se sustenta en la página 205 de la descripción.

2.11 Se modificó la antigua reivindicación 78 (nueva reivindicación 43) con el fin de corregir el error de redacción y reclamar el <u>polipéptido u-PA modificado.</u>

2.12 Se modificó la antigua reivindicación 79 (nueva reivindicación 44), con el de eliminar la referencia a "que comprende un polipéptido de u-PA modificado o una porción catalíticamente activa de un polipéptido de u-PA modificado".

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

2.13 Se modificó la antigua reivindicación 83 (nueva reivindicación 48) con el fin de eliminar la referencia al 98% de identidad en relación con las secuencias que caracterizan el sitio de activación de furina.

2.14 Se modificó la antigua reivindicación 84 (nueva reivindicación 49), con el fin de eliminar la expresión "o porción catalíticamente activa del mismo".

2.15 Se modificó la antigua reivindicación 96 (nueva reivindicación 61) con el fin de eliminar la referencia al 98% o 99% de identidad en relación con las secuencias de activación.

2.16 Se modificó la antigua reivindicación 102 (nueva reivindicación 67) con el fin de corregir la redacción, de manera que la reivindicación reclame una proteína de fusión.

2.17 Se modificó la antigua reivindicación 122 (nueva reivindicación 87), con el fin de:

2.17.1 Eliminar la expresión "para tratar una enfermedad o trastorno mediado por complemento".

2.17.2 Aclarar que el segundo agente "inhibe o reduce la activación del complemento". Dicha modificación se sustenta en las páginas 5, 15 y 16 de la descripción.

Estas modificaciones no amplían de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud, ya que se encuentran sustentadas tanto en la descripción como en el listado de secuencias, y se realizan con el fin de definir la materia reclamada de forma clara y superar las objeciones planteadas por el examinador en su concepto técnico.

3. Modificación a la Descripción

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 a este memorial una descripción modificada que reemplaza

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

completamente el documento presentado el 25 de junio de 2021. Específicamente, se reemplazó el término "urocinasa" por "uroquinasa".

Esta modificación no amplía de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud, ya que se relaciona únicamente con un cambio de términos equivalentes con el fin de superar las objeciones planteadas por el examinador en su concepto técnico.

4. Pago de tasas

Considerando que el presente memorial se presenta junto con modificaciones a las reivindicaciones y a la descripción, se adjunta recibo por concepto de pago de tasa de modificación a la solicitud, según lo establecido en la **Resolución 59669 de 2020.**

Ahora, en relación con el número de reivindicaciones, atentamente me permito resaltar que junto a la presente respuesta no se realiza el pago de la tasa por concepto de reivindicaciones adicionales, dado que el nuevo capítulo reivindicatorio cuenta con un menor número de cláusulas que el presentado y estudiado anteriormente por su despacho.

5. Excepción de Patentabilidad

El examinador objeta que el contenido de las reivindicaciones 122 a 130, debido a que hacen referencia a una combinación de un polipéptido de u-PA y un segundo agente para tratar una enfermedad o trastorno, lo cual es considerado materia exceptuada de patentabilidad por hacer referencia a métodos de tratamiento de conformidad con lo establecido en el artículo 20. d) de la Decisión 486 del 2000.

En ese sentido, el solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo, sin embargo, con el fin de superar las objeciones planteadas, ha decidido modificar la reivindicación 122 para reclamar un segundo agente o agentes para inhibir o reducir la activación del complemento. Dicha modificación se sustenta en, por ejemplo, en las páginas 5, 16 y 16 de la descripción.

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

De ahí que, la reivindicación 122 modificada y las reivindicaciones 123-130 que de ella dependen, no hacen referencia a métodos terapéuticos o quirúrgicos para el tratamiento humano o animal ni métodos de diagnóstico aplicados a humanos o animales. En consecuencia, el solicitante respetuosamente solicita que se dé por superada la objeción y se proceda con el estudio de patentabilidad para dichas reivindicaciones.

6. Claridad y concisión de las reivindicaciones

El solicitante manifiesta que mediante la presentación del nuevo capítulo reivindicatorio quedan subsanadas la totalidad de las objeciones presentadas por el examinador en su concepto técnico, de modo tal que las nuevas reivindicaciones reclaman de manera clara y concisa la invención descrita. Con respecto a las objeciones específicas del examinador, me permito manifestar lo siguiente:

2.1 El examinador objeta la reivindicación 1 por carecer de claridad y sustento en la descripción debido a que se incluye la expresión "Un polipéptido de activador de plasminógeno tipo urocinasa modificado (u-PA), que comprende , en un polipéptido de u-PA no modificado, una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas de (…)", lo que, en opinión del examinador, resulta contradictorio en su redacción debido a que aclara que el polipéptido u-PA es no modificado, sin embargo, posteriormente menciona que tiene una o más modificaciones.

Al respecto el solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del examinador, debido a que la redacción de la reivindicación 1 haría evidente para una persona versada en la materia que el objeto de la presente invención es un polipéptido u-PA modificado, cuya estructura se define por una combinación de modificaciones realizadas en el polipéptido u-PA no modificado. Sin embargo, con el único fin de mejorar la claridad de las reivindicaciones, se modificó la reivindicación 1 para reclamar "un polipéptido u-PA modificado que comprende, en un polipéptido de u-PA no modificado, la modificación V41R, y hasta 17 modificaciones adicionales (…)". En ese sentido, se solicita amablemente reconsiderar la presente objeción y darla por superada.

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

2.2 Así mismo, el examinador objeta la reivindicación 1 por carecer de claridad y sustento en la descripción debido a que menciona que las modificaciones se seleccionan de entre reemplazos, deleciones e inserciones. Sin embargo, la evidencia suministrada en la descripción únicamente provee sustento para sustituciones. En ese sentido sugiere restringir las modificaciones de conformidad con el contenido de la descripción.

Al respecto, el solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del examinador. En ese sentido se desea aclarar que la frase objetada corresponde a una razonable generalización de la descripción de la invención, puntualmente definida en las páginas 3, 5, 7, 36 y 99. Sin embargo, únicamente con el fin de contribuir a delimitar y restringir las posibles modificaciones del polipéptido, se incluyó el grupo de combinaciones de modificaciones de la antigua reivindicación 33 en la reivindicación independiente 1. En ese sentido, se puede evidenciar que el alcance estructural del polipéptido ahora se define de manera clara, y, por ende, se puede considerar superada la objeción al respecto.

2.3 Además, el examinador sugiere modificar la reivindicación independiente 1, con el fin de eliminar la expresión "*, en un polipéptido de u-PA no modificado, una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas de entre (…)*", de manera que la reivindicación 1 se refiera a "*Un polipéptido activador de plasminógeno tipo uroquinasa modificado (u-PA) que comprende las modificaciones (….)".*

Sin aceptar la opinión del examinador, y únicamente con el fin de dar continuidad al proceso, se ha decidido modificar la reivindicación 1 con el fin de eliminar la expresión "*en un polipéptido de u-PA no modificado, una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas de entre (…)*" y hacer referencia a las mutaciones puntuales del polipéptido u-PA modificado. En este sentido, amablemente se solicita dar por superada la presente objeción.

2.4 Adicionalmente, el examinador objeta la reivindicación 1 por carecer de claridad al emplear los términos "*uno o más*" y "*modificaciones de aminoácidos*

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

conservadoras de los mismos", ya que lo considera impreciso para definir el número de modificaciones y, por ende, el alcance estructural de polipéptido.

Nuevamente sin aceptar la opinión del examinador, y únicamente con el fin de dar continuidad al proceso, se ha decidido modificar la reivindicación 1 con el fin de eliminar los términos "*uno o más*" y "*modificaciones de aminoácidos conservadoras de los mismos*". En este sentido, amablemente se solicita dar por superada la presente objeción.

2.5 La reivindicación 1 también fue objetada por el examinador dado que la expresión *"el polipéptido de u-PA modificado escinde una proteína de complemento para inhibir o reducir de este modo la activación de complemento en comparación con el polipéptido de u-PA no modificado que no contiene las modificaciones de aminoácidos"* haría referencia a resultados a alcanzar con lo cual se podrían incluir variantes estructurales del polipéptido no contemplados en la descripción, lo que resulta ser impreciso al momento de definir el alcance de la invención.

Al respecto, el solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del examinador, y afirma que la descripción proporciona más de 900 polipéptidos modificados que comprenden modificaciones de aminoácidos. Dichas modificaciones incluyen inserciones, eliminaciones y reemplazos. Además, el solicitante desea resaltar que, de acuerdo con la practica local, la inclusión de resultados a alcanzar puede ser aceptada si las características técnicas esenciales se mencionan en la reivindicación independiente, tal como se establece en la guía de anticuerpos de 2021, que en la página 36 menciona:

> *"si la reivindicación independiente menciona todas las características técnicas esenciales de la invención y además hace referencia a resultados a alcanzar, o si estos últimos se encuentran en las reivindicaciones dependientes, no se objetará la información relativa a los resultados a alcanzar por Art. 30."* (Énfasis añadido)

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

Al respecto el solicitante desea aclarar que la reivindicación 1 modificada enumera todas las modificaciones específicas de los polipéptidos u-PA modificados y, por lo tanto, define todas las características esenciales de los polipéptidos.

Puntualmente, se estudió la actividad de escisión C3 de todos los polipéptidos u-PA modificados reclamados. Esta actividad se describió, por ejemplo, en la Tabla 14. Dichas características técnicas confieren a los polipéptidos u-PA modificados la capacidad de escindir específicamente C3. Así, debido a que la reivindicación 1 reclama todas las características esenciales, la presencia de resultados a alcanzar debería ser aceptada por el examinador.

Además, tal como puede observarse en la descripción, todos los polipéptidos fueron identificados por su capacidad para reconocer el sitio de escisión en C3. Cada polipéptido modificado reivindicado y/o divulgado en la solicitud posee esta propiedad. Como se describe en la solicitud, las bibliotecas de polipéptidos modificados se examinaron utilizando el polipéptido de trampa de proteasa en el que los polipéptidos que comprenden el sitio diana introducido en un polipéptido de trampa de proteasa, como una serpina modificada, el sitio de escisión en C3, se muestran y entran en contacto con los polipéptidos modificados. Los polipéptidos de trampa de proteasa modificada capturan covalentemente cualquier polipéptido que reconozca el sitio diana. El sitio objetivo mostrado fueron los residuos de QHARASHLG (residuos 737-745) de C3 humano (SEQ ID NO:47), y todos los polipéptidos capturados por las serpinas que mostraron este sitio. Todos los polipéptidos (más de 900) tienen esta propiedad.

La Tabla A enumera las modificaciones ejemplares citadas en la reivindicación 1 y el ED_{50} de los polipéptidos que contienen las cadenas mutadas.

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
749	R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L	0.92

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
678	R35W/R36Q/H37S/V38P/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L	2.38
277	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K82R/T97aI/L97bA/H99Q/K110aR/C122S/Y149R/M157K	2.47
280	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/K179R	2.49
278	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K92R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	3.04
614	F30Y/R35V/R36H/H37G/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bW/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149E/M157K	3.47
279	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K92S/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	3.48
276	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61R/K62R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	3.51
281	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/K179S	3.87
291	R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	4.38
690	F30Y/R35W/R36T/H37S/V38S/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157R/Q192Y	4.47
272	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	4.68
287	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61S/K62S/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	4.75
751	R35A/H37E/R37aG/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L	4.76
676	R35W/R36Q/H37S/V38T/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151P/M157R	4.78

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
668	F30Y/R35W/H37Y/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	4.92
977	V38E/T39W/V41R/D60aW/Y60bP/L97bG/H99L/C122S	4.94
682	R35W/R36K/H37S/V38E/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S/Q192H	5.01
792	R35Q/H37Y/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aQ/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	5.14
225	I17V/F30Y/R35Q/R36H/H37W/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A	5.21
750	R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192H	5.26
10	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	5.33
675	R35W/R36N/H37S/V38E/T39Y/Y40M/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157S	5.52
802	R35Y/H37D/V38E/T39W/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	5.57
288	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K82S/T97aI/L97bA/H99Q/K110aS/C122S/Y149R/M157K	5.82
744	R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/D97T/T97aE/L97bG/A98S/H99L/C122S	6.17
275	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R/M157K	6.24
753	R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	6.24
669	F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	6.35

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
286	F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/M157K	6.38
981	R35H/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158A	7.23
656	R35Q/R36H/H37Y/V38E/T39Y/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	7.33
705	R35W/H37P/R37aG/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	7.4
824	V38D/V41Q/D60aH/Y60bS/T97aW/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/R217E/K224R	7.48
731	F30Y/R35W/R36H/H37P/R37aQ/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	7.52
677	F30Y/R35W/R36Q/H37S/V38P/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157R	7.55
679	F30H/R35W/R36T/H37S/V38P/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S	7.59
613	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	7.64
707	F30Y/R35Y/R36H/H37N/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61E/R72H/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q169K	7.64
688	R35W/R36Q/H37S/V38S/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S/Q192H	8.04
752	R35W/H37G/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192T	8.07
19	R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	8.13
290	F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S	8.23

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
616	F30Y/R35V/R36H/H37G/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	8.3
670	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	8.44
285	F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	8.44
283	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/M157K	8.6
284	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S	8.78
683	F30Y/R35W/R36S/H37S/V38Q/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S/Q192N	8.86
727	F30Y/R35W/R36H/H37P/R37aD/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aE/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	8.9
799	R35Q/H37Y/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	8.95
949	R37aS/V38E/Y40V/V41R/H99L/C122S/Y151L/R217V	9.04
831	V38D/V41R/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217E	9.09
33	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	9.27
624	F30Y/R35V/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	9.54
223	I17V/F30Y/R35Q/R36H/H37W/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	9.65
617	F30Y/R35V/R36H/H37S/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bS/T97aM/L97bA/H99Q/C122S/Y149W/M157K	10.2
703	R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	10.3

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
706	N26D/F30Y/R35Y/R36H/H37E/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/R110dS/P114S/C122S/Y149R/M157K	10.3
732	F30Y/R35W/R36H/H37P/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	10.3
796	R35L/H37D/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	10.4
14	F30Y/R35W/R36H/H37P/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	10.6
29	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	10.6
979	R35H/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158S/E167K	10.6
24	R35Q/H37Y/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	10.7
633	F30Y/R35Y/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	10.8
12	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	10.8
708	F30Y/R35Y/R36H/H37E/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/T242A	11.1
557	F30Y/R35L/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A	11.3
724	F30Y/R35Y/R36H/H37P/R37aQ/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bH/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	11.3
882	V38D/V41R/L97bR/H99E/C122S/Y151L/R217E	11.4
335	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/R217E/K224R	11.5

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
746	R35Y/H37V/R37aW/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192T	11.6
615	F30Y/R35M/R36H/H37G/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bP/T97aF/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	11.7
684	F30Y/R35W/R36Q/H37S/V38T/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157K/Q192T	11.8
701	R35W/H37D/R37aP/V38E/T39W/V41R/D60aR/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	11.8
260	I17V/F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	11.9
218	I17V/F30Y/R35Q/H37W/V38D/Y40H/V41R/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K/T158A	12
978	R35H/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/I138V/E167K	12.1
680	F30Y/R35W/R36Q/H37S/V38E/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157T/Q192H	12.4
980	R35H/G37bD/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158S	12.4
794	R35H/H37P/R37aG/V38E/T39F/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	12.6
611	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	12.7
926	V38D/T39Y/Y40L/V41R/L97bI/H99E/C122S/R217E	12.8
224	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A	12.9
689	F30H/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40M/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	13

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
650	R35V/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40M/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	13.1
685	R35W/R36K/H37S/V38A/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157R/Q192T	13.3
628	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	13.5
717	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/N145S/S146V/T147M/D148G/Y149Q/L150F/M157K	13.6
275	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R/M157K	13.7
658	F30Y/R35I/R36H/H37D/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	14.1
373	R35V/V38E/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	14.4
800	R35Q/H37Y/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aN/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	14.5
957	V38E/Y40Q/V41L/L97bG/H99Q/C122S/R217T	14.5
983	R35H/V38E/T39Y/V41R/T56S/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158S	14.6
513	F30H/R35Q/H37W/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	14.7
300	R35Q/H37Y/V38E/T39Y/V41R/D60aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	14.7
745	R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41K/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192A	14.8
821	V38D/V41R/Y60bR/T97aW/L97bR/H99E/C122S/E175D/R217E/K224R	14.8

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
674	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/Y40H/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	15.1
823	V38D/V41L/Y60bP/T97aM/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/R217E/K224R	15.3
627	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	15.4
13	F30Y/R35W/R36H/H37N/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	15.7
681	F30Y/R35W/R36K/H37S/V38D/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157R/Q192T	15.9
382	V41R/H99Q/C122S/Y151L/R217V	16
959	V38E/Y40P/V41L/L97bG/H99L/C122S/Y151Q/R217E	16
950	V38E/Y40L/V41R/H99L/C122S/Y151L/R217S	16.1
956	V38E/Y40Q/V41L/L97bG/H99Q/C122S/Y151P/R217T	16.4
973	V38E/T39Y/V41R/D60aW/Y60bP/L97bR/H99I/C122S	16.4
20	R35W/H37D/R37aP/V38E/T39W/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	16.6
597	F30Y/R36H/H37F/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bD/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	16.8
664	F30Y/R35W/R36H/H37E/S37dP/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	16.8
733	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aA/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	17.4
469	R36H/V38D/V41R/A96D/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/T178S/R217D	17.5
830	V38D/V41R/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217A	17.7

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
653	F30H/R35Q/R36H/H37Y/V38E/T39Y/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	17.8
264	F30Y/R35W/R36K/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/K61E/I65T/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	17.9
604	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bS/T97aL/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	18
714	F30Y/R35Q/R36H/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aS/Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	18.1
743	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aG/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	18.1
666	I24N/F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40L/V41R/Y60bQ/N87D/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	18.2
36	V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S	18.2
217	F30Y/R35Q/H37W/V38D/Y40H/V41R/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K/T158A	18.3
263	F30Y/R35W/R36A/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/K61D/I65R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	18.4
221	F30Y/R35Q/R36H/H37W/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	18.6
289	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/K187R/K223R/K224R	18.9
687	R35W/R36Q/H37S/V38E/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S/Q192T	19
986	R35H/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/P60cS/L97bA/H99Q/C122S/I138V/E167K	19.4
18	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aT/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	19.5

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
222	I17V/F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	19.6
271	R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	19.9
982	R35H/V38E/T39Y/V41R/T56A/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S	19.9
538	F30Y/V38D/Y40F/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157R	20.2
953	V38E/Y40A/V41L/L97bG/H99Q/C122S/R217T	20.4
665	I24T/F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	20.6
292	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	20.7
219	I17V/F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A	21.6
747	R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41K/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192T	21.7
514	F30H/R35L/H37D/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K/R217E	21.8
713	F30Y/R35W/R36H/H37D/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aE/Y60bF/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	21.8
619	F30Y/R35L/R36H/H37G/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149M/M157K	22.1
505	I17V/F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	22.2
623	F30Y/R35V/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	22.6
11	R35W/R36H/H37N/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192H	22.8
360	R35V/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	22.8

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
729	F30Y/R35M/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	22.9
834	R35Q/V38D/V41R/L97bG/H99Q/C122S/Y151L	22.9
961	R37aS/V38E/Y40P/V41L/L97bG/H99Q/C122S/Y151Q/R217T	23.4
364	R35V/R37aE/V38E/Y40Q/V41L/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	23.5
486	F30H/V38D/V41R/A96G/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	23.7
311	T39L/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	23.7
265	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	23.8
34	Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	23.9
586	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/S146F/M157K/Q192H/K243Q	24.1
346	Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	24.1
262	F30Y/R35W/R36Q/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/K61L/I65V/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	24.4
21	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	24.5
832	R35Q/V38D/V41R/T97aS/L97bA/H99Q/C122S/Y151L	24.8
369	V41R/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217V	25.1
30	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	25.3
621	F30Y/R35V/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149E/M157K	25.4
754	R35A/H37T/R37aD/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192S	25.5
835	R35S/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L	25.7

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
836	R35S/V38D/V41L/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217Q	26.1
562	F30Y/R35H/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158S	26.3
738	R35Q/H37S/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	26.3
338	H37G/R37aD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	26.7
341	H37G/R37aD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E	26.8
741	R35W/H37D/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aE/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	26.9
795	R35Q/H37G/R37aD/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	27.1
798	R35Q/H37D/R37aK/V38E/T39F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	27.1
671	R35Y/R36H/H37S/V38D/T39Y/V41R/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	27.3
230	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	27.9
829	R37aS/V38D/V41Q/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217T	27.9
484	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	28.1
693	F30Y/R35K/R36H/H37E/R37aK/V38E/T39F/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	28.1
694	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bG/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	28.3
261	F30Y/R35W/R36Q/H37E/V38A/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/K61D/I65V/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	28.4

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
494	F30Y/R35H/V38D/Y40H/V41R/T56A/L97bA/H99Q/C122S/M157K	28.5
797	R35N/H37T/R37aY/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	28.7
984	R37aH/V38E/T39Y/V41R/T56A/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158A	28.8
515	F30H/R35Q/H37T/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	28.9
503	F30H/R36L/V38E/V41R/K82R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	29
370	V38D/V41R/H99Q/C122S/Y151L/R217V	29.1
736	R35Q/H37G/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	29.2
726	F30Y/R35Q/R36H/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aE/Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	29.3
704	R35Q/H37Y/R37aD/V38E/T39L/V41R/D60aE/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	29.4
657	F30Y/R35L/R36H/H37E/V38E/T39N/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	29.6
963	R36S/V38E/Y40L/V41N/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217T	29.6
401	T39W/V41R/L97bG/H99Q/C122S	29.7
9	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	29.8
28	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	29.8
940	R35S/R37aA/V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y149V	30.2
612	F30Y/R35W/R36H/H37Q/V38E/T39H/Y40H/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	30.3

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
715	F30Y/R35Q/R36H/H37Y/R37aD/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bV/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	30.4
171	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/Y151L/M157K	30.6
511	F30H/R35H/H37I/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149W/Y151L/M157K/R217S	30.6
875	V38D/T39Y/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	30.7
702	R35F/H37D/R37aN/V38E/T39Y/V41R/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	30.9
402	T39Y/V41R/Y60bQ/L97bG/H99Q/C122S	31.1
398	T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S	31.4
881	V38D/V41R/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217E	31.5
924	R36S/V38D/T39L/Y40L/V41R/L97bI/H99E/C122S/R217T	31.5
936	R35S/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/Y60bV/T97aL/L97bA/H99Q/C122S/Y149L	31.5
350	Y40Q/V41L/Y60bT/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	31.6
496	F30Y/V38E/Y40H/V41R/T56A/L97bA/H99Q/C122S/M157K/K243M	31.9
231	F30Y/R36H/R37aH/V38E/Y40H/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	31.9
516	F30H/R35Q/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	32
818	V38D/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	32
324	H37G/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	32.1
948	R35S/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	32.2

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
368	R35V/R37aE/V38E/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S	32.2
351	Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	32.5
551	F30Y/R35H/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/I138V/M157K	33.1
43	T39Y/V41R/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S	33.2
696	F30Y/R35H/R36H/H37D/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	33.4
495	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A	33.5
972	V38E/T39W/V41R/D60aP/Y60bD/L97bA/H99L/C122S	33.5
242	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/I65T/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	33.6
884	V38D/V41R/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217V	33.7
801	R35Q/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	33.8
673	R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	34
958	R36S/V38E/Y40Q/V41R/L97bG/H99L/C122S/Y151P/R217E	34.3
15	V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	34.5
340	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E	34.5
339	H37G/R37aD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E	34.8
282	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/K187S/K223S/K224Y	34.9
39	Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S	35.2

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
504	F30H/R35H/V38D/V41R/K61E/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K/R206H	35.4
8	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	35.7
273	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	35.7
943	R35A/R37aE/V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	35.9
827	V38D/V41L/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217Q	36.2
517	F30H/R35Q/H37W/V38D/V41R/D60aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/Y151L/M157K/R217D	36.4
620	F30Y/R35F/R36H/H37G/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bS/T97aD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	36.7
399	T39Y/V41R/L97bG/H99Q/C122S	36.8
608	F30Y/R35I/R36H/H37E/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bS/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	36.9
934	R35S/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	37.2
387	Y40H/V41Q/L97bG/H99Q/C122S/R217T	37.2
645	R35W/H37D/V38D/T39Y/V41R/Y60bS/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	37.4
869	V38D/T39F/Y40L/V41R/T97aW/L97bA/H99Q/C122S	37.8
878	V38D/T39Y/Y40L/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S	37.8
718	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39F/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	38.2
873	V38D/T39L/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	38.2
876	V38D/T39Y/Y40L/V41R/T97aW/L97bA/H99Q/C122S	38.4
550	F30Y/R36H/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99L/C122S/F141L/M157K/T158A	38.5

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
728	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aA/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	38.5
712	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	38.6
404	T39Y/V41R/Y60bP/L97bG/H99Q/C122S	39.2
507	F30H/R36H/V38D/V41R/T56A/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	40
720	F30Y/R35E/R36H/H37D/R37aN/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	40
268	V38E/Y40Q/V41L/D60aP/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S/Y149W	40.4
498	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	40.5
509	F30H/R35Q/H37W/V38D/V41R/D60aE/Y60bS/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/Y151L/M157K	40.8
742	R35Q/H37G/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	40.9
686	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151P/M157K/Q192H	41
710	F30Y/R35M/R36H/H37D/R37aD/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	41.2
618	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bT/T97aD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	41.3
872	V38D/T39L/Y40L/V41R/T97aV/L97bA/H99Q/C122S	41.6
822	V38D/V41R/Y60bS/T97aI/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192F/R217E/K224R	42.1
403	T39Y/V41R/Y60bP/L97bA/H99Q/C122S	42.1
446	R36H/V38D/Y40F/V41R/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L/Q192E/R217D	42.2

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
735	R35M/H37G/R37aD/V38E/T39W/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	42.3
543	F30Y/V38D/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K/Q192H	42.4
475	F30H/V38D/Y40F/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157F	42.5
697	H37M/R37aD/V38E/T39A/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	42.7
171	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/Y151L/M157K	42.8
552	T22I/F30Y/R35S/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/I138V/M157K	42.9
734	R35L/H37D/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	42.9
561	F30Y/R35L/V38D/Y40H/V41R/N76S/L97bA/H99Q/C122S/M157K/K187E	43.6
481	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157S	43.8
648	R35W/H37D/V38D/T39Y/V41R/Y60bH/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	44.2
595	F30Y/R36H/H37G/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149Q/M157K	44.6
904	R35Q/H37G/R37aE/V38W/T39Y/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	44.6
330	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	44.6
879	V38D/T39Y/Y40M/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S	45
647	R35Q/H37N/V38D/T39Y/V41R/Y60bP/L97bA/H99Q/C122S	45.4
663	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	45.8

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
23	R35Q/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	46.1
975	V38E/T39L/V41R/D60aN/Y60bP/L97bG/H99Q/C122S	46.8
601	F30Y/R36H/H37A/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	46.9
722	F30Y/R35W/R36H/H37E/R37aP/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149Q/M157K	47.7
748	H37T/R37aL/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192R	47.9
325	H37G/R37aD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	47.9
667	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/Y40H/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	48.6
868	V38D/T39W/Y40L/V41R/T97aL/L97bA/H99Q/C122S	48.9
326	H37G/R37aD/G37bD/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	49
42	T39Y/V41R/L97bA/H99Q/C122S	49
874	V38D/T39L/Y40L/V41R/T97aW/L97bA/H99Q/C122S	49.1
584	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149N/L150V/M157K	49.3
534	R35S/V38D/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157Y	49.8
925	R37aS/V38D/T39Y/Y40F/V41R/H99L/C122S/R217T	49.9
349	Y40Q/V41L/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	49.9
390	Y40H/V41T/L97bG/H99Q/C122S/R217T	50
506	F30H/R35S/V38E/V41R/Y60bH/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	50.1
877	V38D/T39Y/Y40M/V41R/T97aW/L97bA/H99Q/C122S	50.1

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
900	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	50.9
737	R35A/H37G/R37aE/V38E/T39F/V41R/D60aE/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	51.1
22	H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	51.1
598	F30Y/R36H/H37N/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	51.4
545	F30Y/V38D/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157A/Q192Y	51.5
954	V38E/Y40H/V41Q/L97bG/H99Q/C122S/R217T	51.6
870	V38D/T39Y/Y40Q/V41L/T97aY/L97bA/H99Q/C122S	51.7
942	R35V/R37aE/V38E/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	51.7
358	R35S/Y40Q/V41L/Y60bT/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	52.4
535	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157T	52.9
356	R35K/Y40Q/V41L/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	53.2
692	F30Y/R35V/R36H/H37T/V38E/T39A/Y40L/V41Q/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	53.7
184	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K/R217D	54
249	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/I65T/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	54.1
672	R36H/H37S/V38E/T39W/V41R/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	54.1
371	V38D/V41R/L97bR/C122S/Y151L/R217V	54.3
553	F30Y/R36S/V38D/T39I/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/S146P/M157K/T158S	54.6

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
365	R35V/R37aE/V38E/Y40Q/V41L/Y60bS/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	54.6
37	V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/H99Q/C122S	54.9
347	R37aE/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S	54.9
709	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39F/Y40F/V41R/D60aS/Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	55.3
487	F30H/G37bD/V38D/T39H/V41R/L97bA/H99Q/R110dH/C122S/Y151L/M157K/S240I	55.5
902	R35K/H37A/R37aE/V38H/T39Y/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	55.9
603	F30Y/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bN/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	56
25	R35Q/H37Y/R37aE/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	56.2
436	V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L/Q192E/R217D	56.3
606	F30Y/R36H/H37E/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bN/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	56.4
337	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E	56.4
587	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K/K187R	57.7
232	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	58
44	T39Y/V41R/D60aP/L97bA/H99Q/C122S	58.2
329	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	58.5

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
216	I17V/F30Y/R35Q/H37W/V38D/Y40H/V41R/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K	58.6
519	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149W/M157K/R217D	58.8
270	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/M157K	59.3
348	R37aE/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	59.3
793	R35N/H37S/R37aE/V38E/T39F/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	59.5
226	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	59.9
719	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aL/V38E/T39N/Y40F/V41R/D60aP/Y60bT/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	59.9
625	F30Y/R35V/R36H/H37G/V38E/T39L/Y40H/V41R/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192T/R239H	60.1
903	R35Q/H37G/R37aE/V38Y/T39F/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	60.1
35	V38E/Y40Q/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	60.2
176	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149N/Y151L/M157K	60.3
381	H99Q/C122S/Y151L/R217V	60.4
841	R35S/V38D/Y40H/V41L/Y60bD/L97bG/H99Q/C122S	61.5
698	R35F/H37D/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aE/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	63.4
935	R35V/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/Y60bG/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	63.5
951	R36L/V38E/Y40Q/V41R/L97bG/H99Q/C122S/Y151P/R217S	63.7

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
600	F30Y/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bV/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	63.9
607	F30Y/R36H/H37G/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aA/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	64.2
947	R37aD/V38E/Y40Q/V41L/Y60bP/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149K	64.8
555	F30Y/R35L/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	65.1
357	R37aD/Y40Q/V41L/Y60bT/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	65.3
699	R35A/H37D/R37aN/V38E/T39F/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	65.8
198	I17V/F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	66
267	V38E/Y40Q/V41Q/D60aP/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S/Y149W	66
711	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aN/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	66.2
849	V38D/V41R/Y60bR/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	66.2
518	F30H/R35Q/V38D/V41R/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149N/Y151L/M157K	66.3
313	V38D/T39L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	66.3
937	R37aP/V38E/Y40Q/V41L/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	67.2
591	F30Y/R36H/H37S/V38E/T39L/Y40H/V41R/Y60bH/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	67.5
901	R35Q/H37G/R37aE/V38Y/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	67.6
955	V38E/Y40H/V41T/L97bG/H99Q/C122S/R217T	67.8
833	V38D/V41Q/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217T	68.6

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
417	V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/R217D	68.8
695	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39I/Y40F/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149M/M157K	69.2
893	R35G/H37T/R37aE/V38T/T39Y/V41Q/Y60bR/T97aF/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	69.7
932	R37aS/V38D/T39Y/V41R/L97bI/H99E/C122S/R217T	70.1
233	F30Y/R36H/R37aH/V38E/Y40H/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	70.3
661	F30H/R35L/R36H/H37E/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	70.4
629	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192M	70.8
807	V38E/T39L/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149V/Y151L/Q192T	71.1
199	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149W/M157K	71.3
725	F30Y/R35F/R36H/H37D/R37aD/V38E/T39H/Y40F/V41R/D60aP/Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	71.3
565	F30H/R35Q/H37Y/V38D/V41R/D60aE/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157K	71.4
376	L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217V	72.3
960	R37aS/V38E/Y40H/V41T/L97bG/H99Q/C122S/R217T	72.6
307	Y40Q/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	73
466	R36H/G37cD/V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/M157T/R217D	75
839	R35K/V38D/Y40H/V41R/Y60bS/L97bG/H99Q/C122S	75.6

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
299	R35Q/H37Y/R37aE/V38D/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	77.3
592	F30Y/R35L/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bA/T97aD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	77.9
520	F30Y/R35Q/H37W/V38D/Y40H/V41R/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K	78.3
389	Y40H/V41Q/L97bG/H99Q/C122S	78.4
400	T39H/V41R/L97bG/H99Q/C122S	78.4
315	V38D/T39L/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S	79
740	R35Q/H37G/R37aE/V38E/T39H/V41R/D60aP/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	80.1
716	F30Y/R35A/R36H/H37T/R37aD/V38E/T39Y/Y40L/V41R/D60aP/Y60bE/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	80.7
700	R35Q/H37D/R37aA/V38E/T39F/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	80.7
312	V38D/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	80.7
651	F30Y/R35L/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192N	80.9
871	R37aS/V38D/T39Y/Y40M/V41R/T97aL/L97bA/H99Q/C122S	81.2
374	R35V/R37aE/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	81.4
359	R37aE/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	81.5
938	R35M/R37aQ/V38E/Y40Q/V41L/Y60bE/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	81.6
38	V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/C122S	82.9
243	F30Y/R36H/V38E/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	83.5

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
500	F30Y/R35H/V38D/T39S/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S/T147S/M157K	84.7
564	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K/Q192H/R239H	85.7
721	F30Y/R36H/H37M/R37aD/V38E/T39G/Y40F/V41R/D60aP/Y60bE/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	85.9
523	F30Y/R35H/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	87.3
544	F30Y/V38D/Y40L/V41Q/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157R/Q192Y	88.1
228	F30Y/R35Q/H37W/V38D/Y40H/V41R/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	88.8
826	V38D/V41Q/Y60bR/T97aW/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	90
985	R37aH/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S	90.7
547	F30H/V38D/V41Q/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157R	91.3
886	V38D/T39Y/Y40L/V41K/L97bR/H99L/C122S/E175D	91.8
944	R37aD/V38E/Y40Q/V41L/Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	91.9
32	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/C122S/Y149R	92.3
542	N26D/F30Y/V38D/Y40H/V41R/I65T/L97bA/H99Q/C122S/M126I/M157K	93.2
946	R35A/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/Y60bV/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K	93.4
939	R35S/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/Y60bT/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	93.5
508	F30H/R35Q/H37T/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149I/Y151L/M157K/R217D	93.6

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	ED_{50} (nM)
541	F30H/V38D/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	94.2
377	V38D/H99Q/C122S/Y151L/R217V	94.4
576	F30Y/R35T/H37T/V38D/Y40H/V41R/D60aP/Y60bD/L97bA/H99Q/C122S/Y149T/M157K	94.7
227	I17V/F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	94.8
855	V38D/V41R/Y60bR/L97bR/H99L/C122S/Y151L/E175D/Q192Y/R217E/K224R	94.9
372	R37aE/V38E/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	95
594	F30Y/R36H/H37E/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	96.3
820	V38D/V41Q/D60aP/Y60bS/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192Y/R217E/K224R	96.4
510	F30H/R35Q/H37Q/V38D/V41R/A96D/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/Y151L/M157K/R217D	96.8
240	F30Y/R35Q/H37Y/V38D/Y40H/V41R/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	98.7
891	H37A/R37aE/V38F/T39L/V41Q/Y60bR/T97aW/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	99.6
605	F30Y/R36H/V38E/T39V/Y40H/V41R/Y60bH/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149S/M157K	99.7
485	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S	99.9
622	F30Y/R35V/R36H/H37S/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192T	100

Por lo tanto, el solicitante desea resaltar que la reivindicación independiente 1 se ha modificado con el fin de incluir todas las posibles variantes estructurales que pueden

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

derivarse del grupo de combinaciones de mutaciones que se encontraba reclamado en la antigua reivindicación 33.

En ese sentido, se solicita reconsiderar la posición sobre la expresión objetada ya que esta no afecta el alcance estructural de la invención que se busca proteger, pues esta está definida por sus características estructurales.

2.6 El examinador también objeta la reivindicación 1 debido a que reclama "*al menos 85%*" en relación con las secuencias SEQ ID NO:1-6, en donde dicho uso de porcentajes de identidad abarcaría un sin número de estructuras que no se encuentran sustentadas en la evidencia suministrada en la descripción. Así mismo, el examinador indica que, comprender modificaciones conservadoras seleccionadas entre R35Y, W, F o N; H37R, Q, E, W o F; V41K; D60aS; T97aD, L o V; L97bG o S; y H99N darían lugar a opciones de polipéptido que no son exploradas por el solicitante.

Al respecto el solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del examinador. Sin embargo, únicamente para dar claridad a la materia reclamada, se modificó la reivindicación 1 para eliminar la referencia a porcentajes de identidad y para reclamar las modificaciones específicas enumeradas en la reivindicación 33 que se encuentran en polipéptidos para los que se proporcionan datos sobre la escisión C3 en la descripción. Adicionalmente, La reivindicación 1 se modifica aún más para reclamar que el polipéptido modificado comprende hasta 17 modificaciones para abarcar todas las cadenas de mutaciones citadas en la reivindicación. Por ende, es posible afirmar que se ha dado claridad a las mutaciones y alcance estructural al polipéptido u-PA reclamado, por lo que es posible dar por superada la presente objeción.

2.7 Por otra parte, el examinador señala que la reivindicación 2 no es clara y carece de sustento en la descripción debido a que se refiere a "una o más" modificaciones seleccionadas de entre R35Q, H37Y, V41R, Y40Q, D60aP, L97bA, T97aI y H99Q, lo cual resulta impreciso para definir el alcance estructural de la invención.

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

El solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del examinador. Sin embargo, únicamente con el fin de dar continuidad al proceso se ha decidido eliminar la reivindicación 2 del capítulo reivindicatorio. En ese sentido es posible dar por superada la presente objeción.

2.8 Igualmente, el examinador objeta la reivindicación 4 debido a que considera que la redacción de la expresión "*o una correspondiente forma de u-PA expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-4 y 6*" no es clara, y en particular la referencia a estar expuesta a dichas secuencias no permite comprender la característica que se desea reclamar de manera adecuada.

El solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del examinador. Sin embargo, únicamente con el fin de dar continuidad al proceso se ha decidido eliminar la reivindicación 4 del capítulo reivindicatorio. En ese sentido es posible dar por superada la presente objeción.

2.9 Así mismo, el examinado objeta el contenido de las reivindicaciones 6 y 45 a 47, debido a que en el preámbulo de la reivindicación hace referencia al polipéptido u-PA modificado, sin embargo, en la caracterización hace referencia a las SEQ ID NO del polipéptido u-PA no modificado. En ese sentido, el examinador sugiere realizar las modificaciones pertinentes de conformidad con la materia divulgada en la descripción.

El solicitante manifiesta respetuosamente no estar de acuerdo con la opinión del examinador. Por el contrario, resalta que la lista de secuencias establece las secuencias de los dominios de la proteasa con las modificaciones, y también establece las secuencias del propéptido u-PA no modificado (SEQ ID NOs:1 y 4); u-PA MADURO (SEQ ID NOs: 3 y 6) y dominio proteasa (SEQ ID NOs: 2 y 5). Todas las modificaciones se encuentran en el dominio de la proteasa. Las reivindicaciones abarcan propéptidos modificados, polipéptidos u-PA maduros modificados y dominios de proteasa modificados. Como se detalla en la solicitud, el u-PA se puede procesar *in vivo* para formar polipéptidos activados de dos cadenas. Los polipéptidos u-PA modificados declarados comprenden los dominios de proteasa modificados.

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

Al definir los polipéptidos no modificados y reclamar las modificaciones, los polipéptidos están completamente definidos. Las reivindicaciones 6 y 45-47 dependen de la reivindicación modificada 1, que reclama un polipéptido activador del plasminógeno de tipo uroquinasa modificado (u-PA), que comprende, en un polipéptido u-PA no modificado, V41R y modificaciones adicionales como se cita en la reivindicación. El polipéptido u-PA no modificado" o "el polipéptido no modificado" como se menciona en las reivindicaciones 6 y 45-47 se refiere al polipéptido u-PA no modificado en el que se introduce la modificación citada en la reivindicación 1. La reivindicación 1 define los polipéptidos no modificados. En consecuencia, las alegaciones 6 y 45 a 47 son claras.

2.10 El examinador también objeta el contenido de la reivindicación 7, debido a que esta carece de claridad y sustento en la descripción ya que hace referencia a porcentajes de identidad que van desde el 90% al 99% de identidad en relación con los SEQ ID NOs: 1-6, lo que daría lugar a reclamar polipéptidos que no han sido contemplados dentro de la delimitación estructural dada en la evidencia suministrada en la descripción.

El solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del examinador. Sin embargo, únicamente con el fin de dar continuidad al proceso se ha decidido eliminar la reivindicación 7 del capítulo reivindicatorio. En ese sentido es posible dar por superada la presente objeción.

2.11 Además, el examinador considera que la reivindicación 8 carece de claridad y sustento en la descripción debido a que hace referencia a que el polipéptido u-PA modificado comprende "*1 o hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 reemplazos, inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con el polipéptido de u-PA no modificado de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6*", sin especificar las modificaciones puntuales. Así mismo, dicha definición abarcaría u sin número de variaciones estructurales que no han sido contempladas en el sustento que provee la descripción. De ahí que el examinador sugiere restringir la materia de la invención únicamente a los polipéptidos que encuentran sustento

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

en la descripción con sus respectivas SEQ ID NO: y las modificaciones que comprenden.

El solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del examinador. Sin embargo, únicamente con el fin de dar continuidad al proceso se ha decidido eliminar la reivindicación 8 del capítulo reivindicatorio. En ese sentido es posible dar por superada la presente objeción.

2.12 Por otra parte, el examinador objeta el contenido de las reivindicaciones 9 a 20 por carecer de claridad y sustento en la descripción debido a que no se evidencian en la descripción polipéptidos que comprendan únicamente dichas sustituciones, sino que encuentran sustento polipéptidos que tienen seis sustituciones o más. De ahí que el examinador sugiere limitar el alcance de la invención a los polipéptidos sustentados en la descripción con su respectivo SEQ ID NO y modificaciones.

El solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del examinador. Sin embargo, únicamente con el fin de dar continuidad al proceso se ha decidido eliminar las reivindicaciones 9 a 20 del capítulo reivindicatorio. En ese sentido es posible dar por superada la presente objeción.

2.13 Adicionalmente, el examinador objeta las reivindicaciones 21 a 23, 28 a 32, 34 y 35 debido a que hacen referencia a modificaciones estructurales del polipéptido que no han sido contempladas en la evidencia que suministra la descripción. En ese sentido, sugiere restringir el alcance del polipéptido a las variantes exploradas en la presente invención.

El solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del examinador. Sin embargo, únicamente con el fin de dar continuidad al proceso se ha decidido eliminar las reivindicaciones 21 a 23, 28 a 32, 34 y 35 del capítulo reivindicatorio. En ese sentido es posible dar por superada la presente objeción.

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

2.14 Así mismo, el examinador objeta el contenido 24, 25 y 27 debido a que las expresiones "en donde el polipéptido de u-PA modificado tiene ED50 para escisión de inactivación de C3 de menos de o 100 nM, o 50 nM o 30 nM o 25 nM en un ensayo in vitro" y "tiene una ED50 de 100 nM o menos, tiene una ED50 menor de 50 nM o menos, o tiene una ED50 menor de 30 nM, o tiene una ED50 menor de 25 nM" únicamente hacen alusión a resultados a alcanzar y, por tanto, no permiten definir el alcance estructural de la invención al incluir variantes no contempladas en la evidencia suministrada en la descripción. De ahí que sugiere reemplazar por las características técnicas esenciales, estructurales y funcionales, que contribuyen a la obtención de ese efecto.

El solicitante respetuosamente no está de acuerdo. Las reivindicaciones 24, 25 y 27 son reivindicaciones dependientes que, en última instancia, dependen de la reivindicación 1 y, por lo tanto, incluyen al menos todas las limitaciones descritas en la reivindicación 1, más las limitaciones ED_{50} reivindicadas en las reivindicaciones 24, 25 y 27. Por lo tanto, estas reivindicaciones no abarcan ninguna alternativa presente o futura que conduzca al resultado fuera de los polipéptidos u-PA modificados específicamente citados en la reivindicación 1. La reivindicación 1 modificada, al citar todas las modificaciones específicas de los polipéptidos u-PA modificados, define todas las características esenciales de los polipéptidos.

Además, nuevamente se desea resaltar la guía de anticuerpos de 2021en la página 36, en donde establece:

> *"si la reivindicación independiente menciona todas las características técnicas esenciales de la invención y además hace referencia a resultados a alcanzar, o si estos últimos se encuentran en las reivindicaciones dependientes, no se objetará la información relativa a los resultados a alcanzar por Art. 30."* (Énfasis añadido)

Por ende, la reivindicación independiente 1 modificada, de la que dependen en última instancia las reivindicaciones 24, 25 y 27, cita todas las características técnicas esenciales de la invención, porque la reivindicación 1 especifica todas las modificaciones

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

específicas en los polipéptidos u-PA reivindicados. Por lo tanto, las reivindicaciones 24, 25 y 27 no deben ser objetadas por este motivo.

Además, los resultados citados en las reivindicaciones 24, 25 o 27 no "sólo aluden a los resultados que deben alcanzarse". Los resultados citados en la reivindicación 24, 25 o 27 son resultados demostrados dentro de la descripción. Véase, por ejemplo, en Tabla 14 se revelan los SEQ ID NO y las cadenas de mutaciones y los ED_{50} resultantes (como se ha comentado anteriormente) de los polipéptidos modificados reivindicados, que se encuentran dentro de los rangos ED_{50} reivindicados en las reivindicaciones 24, 25 y 27. Las características de las reivindicaciones 24, 25 y 27, que se suman a las características técnicas esenciales establecidas en la reivindicación 1, definen que el polipéptido modificado tiene una mayor actividad y/o especificidad para C3 en comparación con el polipéptido u-PA no modificado.

Por ende, es deseo del solicitante reconsiderar y dar por superada la presente objeción.

2.15 La reivindicación 25, también fue objetada por el examinador debido a que hace alusión a una tabla contenida en la descripción, por lo cual sugiere sea remplazado con las características del polipéptido de manera que la reivindicación sea autosuficiente al definir la invención.

Al respecto, se desea resaltar que, si bien el solicitante no está de acuerdo con la opinión del examinador, amablemente ha decidido modificar la antigua reivindicación 25 (nueva reivindicación 5) para enumerar los polipéptidos modificados citados en la reivindicación 1 (de los que depende en última instancia la reivindicación 25) y que se establecen y sustentan en la Tabla 14 para cumplir con la solicitud del examinador. Por ende, es deseo del solicitante reconsiderar y dar por superada la presente objeción.

2.16 Por otra parte el examinador objeta la reivindicación 26 debido a que busca caracterizar las condiciones de un ensayo, sin embargo, en el preámbulo hace referencia a reclama el polipéptido u-PA modificado. En ese sentido, el examinador sugiere eliminar dicha reivindicación o reemplazar la caracterización del ensayo por características del polipéptido que se busca proteger.

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

Al respecto, se desea resaltar que, si bien el solicitante no está de acuerdo con la opinión del examinador, amablemente ha decidido modificar la antigua reivindicación 26 (nueva reivindicación 6) para especificar que el ED_{50} del polipéptido u-PA se determina mediante la incubación de la proteína humana C3 del complemento de sustrato con varias concentraciones del polipéptido u-PA durante 1 hora a 37 °C. La reivindicación 26, en su forma modificada, proporciona las características del polipéptido. Por ende, es deseo del solicitante reconsiderar y dar por superada la presente objeción.

2.17 El examinador objeta la reivindicación 33 debido a que se refiere a modificaciones en la secuencia del polipéptido, sin embargo, no menciona cual es la secuencia de aminoácidos a la que le aplica dichas modificaciones. Además, el examinador considera que la reivindicación carece de claridad debido a que hace referencia a modificaciones C122C por numeración de quimotripsina, sin embargo, no cualquier polipéptido modificado comprende dicha mutación. De ahí que sugiere eliminar dicha expresión ya que no es una generalización razonable de la evidencia suministrada en la descripción.

Al respecto, se desea resaltar que, si bien el solicitante no está de acuerdo con la opinión del examinador, amablemente ha decidido eliminar la reivindicación 33, e incorporar su caracterización a la reivindicación modificada 1, de manera que define las mutaciones incluidas en los polipéptidos, reclama que los polipéptidos contienen hasta 18 modificaciones, y reclama las secuencias de los polipéptidos no modificados (SEQ ID NOs: 1-6). En ese sentido, la reivindicación 1 modificada define así los polipéptidos dentro del alcance de las reivindicaciones y limitando el número de modificaciones.

Además, es deseo del solicitante resaltar que la lista de secuencias establece secuencias del dominio proteasa; Las reivindicaciones abarcan los dominios precursores, maduros y proteasa de los polipéptidos. Al definir los polipéptidos no modificados y reclamar las modificaciones, los polipéptidos están completamente definidos. Los polipéptidos u-PA modificados citados en la reivindicación 33 corresponden a las modificaciones establecidas en los ID de SEQ NO: Los ID de SEQ establecen las secuencias de los dominios de proteasa modificados, no las formas maduras o propeptídicas modificadas.

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

La persona experta puede establecer fácilmente la secuencia de las formas maduras y los propéptidos, ya que las modificaciones ocurren solo en los dominios de la proteasa. Para proporcionar los ID de SEQ NO. para cada uno de los formularios, requeriría añadir otras 1800 secuencias, y no proporcionaría ninguna información que no esté ya en la solicitud y que no se cite claramente en las reivindicaciones.

La reivindicación reclama las modificaciones y reclama los polipéptidos no modificados en los que se introducen las modificaciones. La afirmación también menciona que todos los polipéptidos incluyen el dominio proteasa. Por lo tanto, las secuencias completas de polipéptidos que contienen las modificaciones citadas.

2.18 Adicionalmente, el examinador objeta las reivindicaciones 36 a 44 debido a que carecen de claridad y sustento en la descripción, dado que el examinador considera que no hay evidencia que sustente polipéptidos con únicamente los remplazos:

- R35Q/H37Y/T39Y/V41R,
- R35Q/H37Y/T39Y/V41R/C122S,
- R35Q/H37Y/T39Y/V41R/L97bA/H99Q/C122S,
- R35Q/H37Y/T39Y/V41R/L97bA/H99Q.,
- T39Y/V41R/D60aP/L97bA/H99Q,
- T39Y/V41R/D60aP/L97bA/H99Q,
- Y40Q/V41R/L97bA/C122S,
- Y40Q/V41R/L97bA/C122S,
- Y40Q/V41L/L97bA,
- Y40Q/V41R/L97bA,
- R37aS/V41R/L97bG/H99Q,
- T39Y/V41L/L97bA/H99Q,
- R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149,
- H99Q,
- R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

De ahí que sugiere realizar las aclaraciones pertinentes y reclamar únicamente los polipéptidos divulgados en la descripción con su respectivo SEQ ID NO.

Sin estar de acuerdo, pero con el fin de dar continuidad al proceso, el solicitante ha decidido eliminar las reivindicaciones 36 a 43 sin perjuicio ni exención de responsabilidad. Por otra parte, la antigua reivindicación 44 (nueva reivindicación 9) reclama el polipéptido u-PA modificado correspondiente a los SEQ ID NO: 18 y 21 establecidos en la Tabla 14, y sus homólogos en los que C122S no está modificado y es C122C por numeración de quimotripsina. La reivindicación 9 está plenamente respaldada por la descripción. Al igual que con la reivindicación 33, las reivindicaciones reclaman los polipéptidos no modificados y las modificaciones, definiendo así los polipéptidos adecuadamente. Por ende, es deseo del solicitante reconsiderar y dar por superada la presente objeción.

2.19 Por otra parte, el examinador objeta la reivindicación 45 debido a que considera que el contenido de la reivindicación no es claro al referirse a el dominio de proteasa de la SEQ ID NO: 5.

El solicitante respetuosamente no está de acuerdo. En ese sentido, desea resaltar que la descripción define un "dominio proteasa".

En las páginas 31 y 32 de la descripción se indica lo siguiente:

> *"Como se usa en la presente, un "dominio de proteasa" es la porción catalíticamente activa de una proteasa. La referencia a un dominio de proteasa de una proteasa incluye las formas individuales, de dos y múltiples cadenas de cualquiera de estas proteínas. Un dominio de proteasa de una proteína contiene todas las propiedades requeridas de esa proteína requeridas para su actividad proteolítica, tal como, por ejemplo, su centro catalítico.*
>
> *Como se usa en la presente, una "porción catalíticamente activa" o "dominio catalíticamente activo" de una proteasa, por ejemplo, un polipéptido de u-PA, se refiere al dominio de proteasa, o cualquier fragmento o porción del mismo que*

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

retenga la actividad de proteasa. Por ejemplo, una porción catalíticamente activa de un polipéptido de u-PA puede ser un dominio de proteasa de u-PA que incluye una forma de cadena individual aislada del dominio de proteasa o una forma de cadena doble activada. De manera significativa, al menos in vitro, las formas de cadena individual de las proteasas y dominios catalíticos o porciones proteolíticamente activas de las mismas (habitualmente truncamientos en el extremo C-terminal) exhiben actividad de proteasa."

Establece además la página 33 de la descripción [énfasis añadido]:

"El u-PA humano incluye u-PA, variantes alélicas, isoformas, moléculas sintéticas de ácidos nucleicos, proteína aislada de células y tejidos humanos y formas modificadas de los mismos. Los polipéptidos de u-PA humanos de ejemplo no modificados incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de u-PA maduros naturales no modificados y tipo silvestre (SEQ ID NO:3), el polipéptido de u-PA precursor no modificado y tipo silvestre que incluye un propéptido y/o péptidos de señal (tal como el polipéptido de u-PA expuesto en SEQ ID NO:1) y el dominio de proteasa (tal como el dominio de proteasa de u-PA expuesto en SEQ ID NO: 2)."

También en la página 35 menciona:

"En un ejemplo, la porción de u-PA es el dominio de proteasa, tal como, por ejemplo, el dominio proteasa expuesto en SEQ ID NO: 2 que corresponde a aminoácidos 179-431 de la secuencia de u-PA expuesta en SEQ ID NO: 1."

y

"Los dominios de proteasa de u-PA humana de referencia de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, dominio de proteasa de u-PA no modificado y tipo silvestre (SEQ ID NO:2) y un dominio de proteasa alternativo (tal como el dominio de proteasa de u-PA expuesto en SEQ ID NO: 5)."

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

Por lo tanto, la descripción define explícitamente el término "dominio de proteasa" y enumera SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 5 como ejemplos.

En vista de lo anterior, el significado de "el dominio de la proteasa" tal como se menciona es claro y está plenamente respaldado por la descripción. Las reivindicaciones definen el dominio de la proteasa con referencia a los SEQ ID NO: 2 y 5.

2.20 El examinador también objeta la reivindicación 50 debido a que carece de claridad y sustento en la descripción, debido a que reclama secuencias del polipéptido que no habían sido contempladas en las reivindicaciones 1 a 49 de las cuales depende. Por el contrario, considera que la reivindicación 50 incluye características técnicas esenciales que deberían estar reclamadas en la reivindicación independiente 1. Asimismo, dicha reivindicación 50 reclama mutaciones que no están presentes en todas las secuencias que señala, como, por ejemplo, la V41R o V41L. Por ende, el examinador sugiere mencionar las mutaciones y las secuencias del polipéptido en la reivindicación independiente y que exista una coherencia con las reivindicaciones dependientes y la evidencia suministrada en la descripción.

El solicitante respetuosamente no está de acuerdo. No obstante, la reivindicación 50 se modifica de tal manera que todas las secuencias enumeradas se reivindican en la reivindicación 1 en su forma enmendada. Estas secuencias se exponen en la Tabla A anterior.

2.21 Así mismo, el examinado objeta el contenido de la reivindicación 56, debido a que carece de claridad debido a que menciona "que se escinde dentro de los residuos QHARASHLG (residuos 737-745) de C3 humana (SEQ ID NO: 47)" pero el polipéptido no puede escindirse a sí mismo, además dicha expresión hace referencia a resultados a alcanzar, los cuales no permiten delimitar adecuadamente la estructura del polipéptido reclamado.

En este sentido, el solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del examinador. Con respecto a la afirmación del examinador de que la reivindicación sólo se refiere a los resultados que deben alcanzarse, como se ha comentado

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

anteriormente, todos los polipéptidos que se identificaron y describieron en la solicitud y se citaron en las reivindicaciones reconocen la secuencia diana de residuos QHARASHLG (residuos 737-745) del C3 humano (SEQ ID NO:47). Por lo tanto, no es un resultado a alcanzar, sino que es una propiedad de los polipéptidos. Por ende, amablemente se solicita dar por superada la presente objeción.

2.22 Adicionalmente, el examinador considera que la reivindicación 57 carece de claridad, puntualmente por la referencia a P1-P1 y RA en la expresión "El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 56, en donde P1-P1' es RA". De ahí que el examinador sugiere realizar las aclaraciones pertinentes en relación con ambas referencias.

Sin estar de acuerdo, y únicamente con el fin de dar continuidad al proceso, la reivindicación 57 se modifica para describir la característica sin utilizar los términos "P1-P1" y "RA", para reclamar que el polipéptido u-PA modificado escinde los residuos QHARASHLG entre R y A. La reivindicación 57 modificada es clara. Por ende, amablemente se solicita dar por superada la presente objeción.

2.23 En cuanto a las reivindicaciones 58 a 63, 66, 68 y 71, el examinador considera que carecen de claridad debido a que hacen referencia únicamente a resultados a alcanzar, los cuales son imprecisos al momento de definir el alcance de la invención. De modo que, sugiere reemplazar dichos resultados con características puntuales del polipéptido.

El solicitante respetuosamente no está de acuerdo. Las reivindicaciones 58-62, tal como están escritas, se basan en resultados demostrados dentro de la descripción. Véanse, por ejemplo, las Tablas 17 y 18, en las que se enumeran los SEQ ID NO y las cadenas de mutación que se citan en las reivindicaciones 58-62, y la actividad/estabilidad polipeptídica resultante, después de la incubación en PBS, o en un fluido corporal durante 7 días.

Además, el deseo del solicitante resaltar la guía de anticuerpos de 2021 en la página 36, donde establece:

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

"si la reivindicación independiente menciona todas las características técnicas esenciales de la invención y además hace referencia a resultados a alcanzar, o si estos últimos se encuentran en las reivindicaciones dependientes, no se objetará la información relativa a los resultados a alcanzar por Art. 30." (Énfasis añadido)

De ahí que la reivindicación independiente 1 modificada, de la que dependen en última instancia las reivindicaciones 58-62, enumera todas las características técnicas esenciales de los polipéptidos reivindicados. La reivindicación 1 enumera todas las modificaciones específicas en los polipéptidos u-PA reivindicados. Por lo tanto, las alegaciones 58 a 62 no deben ser objetadas por este motivo.

Las reivindicaciones 63, 66, 68 y 71 mencionan características estructurales del polipéptido reivindicado conjugado con otra mitad. La reivindicación 63 dice que el polinucleótido u-PA está conjugado con otra fracción o polímero, ya sea directamente o a través de un enlazador. La reivindicación 66 menciona que el polinucleótido u-PA comprende un polímero que aumenta la vida media sérica y/o reduce la inmunogenicidad, o ambas. La reivindicación 68 menciona que el polinucleótido u-PA está ligado directa o indirectamente a la albúmina sérica. La reivindicación 71 dice que la fracción a la que se conjuga el polinucleótido u-PA es un dominio de multimerización que es un dominio Fc. Por lo tanto, las reivindicaciones 63, 66, 68 y 71 repiten las características del polipéptido reivindicado.

2.23 Igualmente, el examinador objeta el contenido de la reivindicación 64 debido a menciona que el polipéptido de la reivindicación 3 es una proteína de fusión, sin embargo, el examinador considera que no todos los polipéptidos a los que se refiere son proteínas de fusión. Por ende, el examinador sugiere incluir las aclaraciones pertinentes y además incluir la caracterización de la proteína de fusión de conformidad con la evidencia suministrada en la descripción.

El solicitante respetuosamente no está de acuerdo. La descripción proporciona amplios ejemplos y apoyo que se encuentran en la descripción para una proteína de fusión. Por ejemplo, la descripción en las páginas 63 y 64 define una proteína de fusión como:

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

"una proteasa de "proteína quimérica" o "proteína de fusión" se refiere a un polipéptido unido operativamente a un polipéptido diferente. Una proteína quimérica o de fusión proporcionada en la presente puede incluir una o más proteasas o una parte de las mismas, tal como dominios de proteasa de cadena individual de los mismos, y uno o más polipéptidos adicionales para cualquiera de una o más señales de control transcripcionales/traduccionales, secuencias de señales, una etiqueta para localización, una etiqueta para purificación, parte de un dominio de una inmunoglobulina G y/o un agente de direccionamiento. Estas proteínas quiméricas o de fusión incluyen aquellas producidas por medios recombinantes como proteínas de fusión, aquellas producidas por medios químicos, tal como por acoplamiento químico, a través, por ejemplo, de acoplamiento a grupos sulfhidrilo, y aquellas producidas por cualquier otro método mediante el cual al menos una proteasa, o una parte de la misma, está unida, directa o indirectamente a través de ligadores a otro polipéptido."

La descripción proporciona además polipéptidos u-PA ejemplares que son proteínas de fusión, por ejemplo, en el Ejemplo 14 (polipéptido de fusión u-PA-HSA), y sus características farmacocinéticas, por ejemplo, en el Ejemplo 15 (polipéptido de fusión u-PA-HSA). El ejemplo 16 proporciona proteínas de fusión u-PA ejemplares, donde las proteínas de fusión N-terminal contienen: (1) una señal de secreción (p. ej., la región V-111 de la cadena lg kappa del ratón (IgGK) (SEQ ID NO: 999); (2) un socio de fusión (p. ej., IgGl Fe (SEQ ID NO: 992)); (3) enlazador, como AGS (SEQ ID NO: 1003); a la (4) secuencia de activación de u-PA de tipo silvestre (SEQ ID NO: 997; 15 aminoácidos 167-178 de SEQ ID NO: l); y (5) el dominio proteasa u-PA modificado (SEQ ID NO: 987); Proteínas de fusión C-terminal que contienen: (1) una señal de secreción 20 (región V-111 de la cadena lg kappa de ratón (IgGK) (SEQ ID NO: 999); o interleucina-2 humana (hIL2) (SEQ ID NO: 1000)); (2) la secuencia de activación de u-PA de tipo silvestre (SEQ ID NO: 997 o 998), la secuencia de activación de furina (SEQ ID NO: 995, 996 o 1041), o ninguna secuencia de activación; (3) el dominio de proteasa u-PA modificado (SEQ ID NO: 987 o 21) o el dominio de proteasa u-PA de tipo silvestre (SEQ ID NO: 2 o 5); (4) un enlazador 25 (SEQ ID NO: 1002 o 1003); y (5) un socio de fusión (es decir, IgGl Fe (SEQ ID NO: 992); albúmina sérica humana (HSA) (SEQ ID NO: 991);

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

cFv que se une al colágeno Ilm (C2scFv) (SEQ ID NO: 993); o un dominio de unión al ácido hialurónico (HABD) (SEQ ID NO: 994)); Proteínas de fusión C-terminal que contienen la región N-terminal u-PA que contiene: (1) una señal de secreción (región V-111 de la cadena kappa lg de ratón (IgGK); SEQ ID NO: 999); (2) la región N-terminal u-PA de tipo silvestre (aminoácidos 21-178 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 1042); (3) una secuencia de activación ofu-PA (SEQ ID NO: 997 o 998) o una secuencia de activación de furina (SEQ ID NO: 995, 996 o 1041); (4) el dominio catalítico u-PA modificado (SEQ ID NO: 987 o SEQ ID NO: 5, excepto con Cl22, por numeración de quimotripsina, o SEQ ID NO: 21); (5) un enlazador (SEQ ID NO: 1002 o 1003); y (6) un compañero de fusión (es decir, IgG 1 Fe (SEQ ID NO: 992); albúmina sérica humana (HSA) (SEQ ID NO: 991)); y también se generaron proteínas de fusión que contenían SUMO en el extremo N-terminal y el compañero de fusión en el extremo C-terminal. Las construcciones contenían (de N-terminal a C-terminal): (1) una señal de secreción (ratón lg kappa cadena V-111 región (IgGK) (SEQ ID NO: 999)); (2) una secuencia de enlazador HIS y SUMO (SEQ ID NO: 990); (3) el dominio catalítico u-PA modificado (SEQ ID NO: 987); (4) un enlazador (SEQ ID NO: 1002); y (5) un compañero de fusión 15 (es decir, IgG 1 Fe (SEQ ID NO: 992); o albúmina sérica humana (HSA) (SEQ ID N.º: 991)). Las tablas de las páginas 273-274 de la descripción resumen varias proteínas de fusión generadas. Además, las tablas de polipéptidos u-PA modificados ejemplares con fusiones N-terminal o C-terminal (en las páginas 285-295 de la descripción) proporcionan diecisiete (17) ejemplos enumerados de polipéptidos modificados, y su actividad para escindir C3. En consecuencia, la solicitud proporciona amplios ejemplos y soporte para una proteína de fusión, y la reclamación de la proteína de fusión en la reivindicación 64 es clara y está totalmente respaldada por la descripción.

2.24 Las reivindicaciones 66 a 68 también son objetadas por el examinador por carecer de claridad y sustento en la descripción porque reclaman un polipéptido enlazado a albumina de suero humano, sin embargo, no se evidencia que dicho polipéptido tenga un polímero en su estructura o se encuentre enlazado a albumina. En ese sentido, el examinador sugiere incluir las aclaraciones pertinentes y restringir las características del péptido, a la evidencia suministrada en la descripción.

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

Como se discutió anteriormente con respecto a la antigua reivindicación 64 (nueva reivindicación 29), la descripción proporciona amplios ejemplos y apoyo para el u-PA modificado que comprende un polímero y/o está unido a la albúmina sérica.

2.25 Del mismo modo, el examinador objeta la reivindicación 72, debido a que hace referencia a porcentajes de identidad de al menos 90% o 95%, lo que resulta impreciso al definir el alcance estructural del dominio Fc. En ese sentido, el examinador sugiere eliminar dichos porcentajes del contenido de la reivindicación.

El solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del examinador. Sin embargo, únicamente con el fin de dar continuidad al proceso se ha decidido eliminar la reivindicación 72 del capítulo reivindicatorio. En ese sentido es posible dar por superada la presente objeción.

2.26 El examinado objeta la reivindicación 78, debido a que carece de claridad al referirse a "*El u-Pau modificado".* De ahí, que el examinador sugiere corregir la redacción y referirse a "*El polipéptido u-PA modificado".*

En este sentido, el solicitante amablemente a aceptado la sugerencia del examinador y ha decidido modificar la antigua reivindicación 78 (nueva reivindicación 43) de manera que reclame el polipéptido u-PA modificado. En ese sentido es posible dar por superada la presente objeción.

2.27 Además, el examinador objeta la reivindicación 101, debido a que considera que el término "secuencia de señal", es impreciso ya que no es claro a que secuencia se refiere y la caracterización en la que se menciona se consideran resultados a alcanzar. De modo que, el examinador sugiere realizar las aclaraciones pertinentes y reemplazar los resultados a alcanzar por características del polipéptido en concordancia con lo divulgado en la descripción.

Al respecto el solicitante desea aclarar que la secuencia de señales se define a lo largo de toda la descripción. Por ejemplo, la descripción en la página 11, dispone lo siguiente:

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

> *"También se proporcionan proteínas de fusión que contienen los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente y polipéptidos adicionales, tal como albúmina sérica, dominios de multimerización, secuencias señal y otras secuencias y etiquetas de tráfico para facilitar la expresión y aislamiento. Las proteínas de fusión también pueden incluir secuencias de activación para activar las porciones de u-PA. Las formas activas de las proteínas de fusión se producen tras la expresión y eliminación de secuencias de señal, y cualquier otra señal de procesamiento y tráfico para dar como resultado proteínas de fusión activas que escinden C3. Las formas activas de las proteínas de fusión incluyen 2 formas activadas en cadena y también dímeros, tal como aquellos que resultan de la inclusión de un dominio de multimerización."*

Las secuencias de señales en la proteína de fusión no aparecerán en un producto farmacéutico tal como se produce y administra a un sujeto. Las secuencias de señales están presentes en los polipéptidos producidos in vitro. Véase la descripción en la página 12, donde describe detalladamente la eliminación de la secuencia de señales. Por ejemplo:

> *"En particular, la secuencia de señal se elimina antes del uso o tras la expresión in vivo o cuando se produce in vitro"*

Véase, asimismo, la descripción en la página 146:

> *"Habitualmente, una secuencia líder se fusiona a la proteína a expresar que dirige la proteína al periplasma. Después, el líder se retira mediante peptidasas de señal dentro del periplasma."*

En vista de lo anterior, la reivindicación 101 modificada está plenamente respaldada por la descripción y establece claramente el objeto.

2.28 El examinador también objeta la reivindicación 102, debido a que menciona "una fusión", lo cual en el contexto de la reivindicación no es claro cual es el producto que está reclamando. Además, la expresión "*es una forma activada de dos cadenas que contiene una cadena A y una cadena B"* hace referencia a resultados a alcanzar, en lugar de referirse a características técnicas esenciales de la materia

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

que se busca proteger. Por ende, el examinador sugiere realizar las aclaraciones pertinentes y reemplazar los resultados a alcanzar por las características técnicas esenciales de la materia reclamada en concordancia con lo divulgado en el capítulo descriptivo.

En este sentido, únicamente para dar continuidad al proceso se ha modificado la reivindicación 102 para reclamar una "proteína de fusión" para mayor claridad. De ahí que la reivindicación 102 reclama un polipéptido u-PA de proteína de fusión que es una forma activada de dos cadenas que contiene una cadena A y una cadena B y, como tal, define estructuralmente el producto. La estructura de la forma activada de dos cadenas, tal como se describe en la descripción, proporciona la función y las características esenciales de la proteína reivindicada. Por ejemplo, la descripción en la página 12 dice:

> *"Las proteínas de fusión también pueden incluir una secuencia de activación de modo que la proteína de fusión resultante que contiene u-PA se encuentre en una forma activa, tal como una forma de dos cadenas. Las secuencias de activación pueden contener o modificarse para contener una cisteína, que puede formar un enlace de disulfuro con una Cys libre, tal como C122, en el polipéptido de u-PA modificado, mediante el cual, tras la activación, el polipéptido activado resultante comprende dos cadenas. Las secuencias de activación de ejemplo son una secuencia de activación de u-PA y una secuencia de activación de furina, y formas modificadas de las mismas, esta secuencia de activación que tiene la secuencia expuesta en cualquiera de SEQ ID NO:995-998, 1041, y 1044 o una secuencia que tiene al menos 98% o 99% de identidad de secuencia con la misma."*

Véase también la descripción en la página 18 donde establece:

> *"En general, la forma administrada de los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente es una forma activada, que en general, dependiendo de los componentes de la proteína (ver, por ejemplo, Ejemplo 15), es una forma de dos cadenas."*

Véase la descripción también, en las páginas 76 y 77:

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

"Los polipéptidos de u-PA se sintetizan y secretan como moléculas de zimógenos de cadena individual (también llamadas prouroquinasas o uroquinasas de cadena individual), que se convierten en u-PA de doble cadena activos mediante una variedad de proteasas que incluyen, por ejemplo, plasmina, calicreína, catepsina B, matriptasa y factor de crecimiento nervioso gamma. La escisión para generar la forma de dos cadenas se presenta entre los residuos 158 y 159 (SEQ ID NO:3) en la secuencia de prouroquinasa humana (correspondiente a los residuos de aminoácidos 178 y 179 en SEQ ID NO:1). Las dos cadenas resultantes están unidas por un enlace de disulfuro entre Cys148 y Cys279, formando de esta manera la forma de dos cadenas de u-PA. La forma de dos cadenas de u-PA también se llama u-PA de alto peso molecular (HMW-u-PA). HMW-u-PA se puede procesar adicionalmente en u-PA de bajo peso molecular (LMW-u-PA) mediante escisión de la cadena A en una cadena corta A (A1, aminoácidos 136-157 de SEQ ID NO:3) y un fragmento amino-terminal. Disulfuro enlazado 21-178 a 179-411 enlazado mediante Cys correspondiente a Cys148 y Cys279 (SEQ ID NO:3)."

Por último, véase la descripción en la página 155:

"Para su uso como productos farmacéuticos, los polipéptidos de u-PA modificados en general se proporcionan en forma activada, tal como una forma activada de dos cadenas. Se entiende que el siguiente análisis describe los polipéptidos de fusión que pueden incluir secuencias señal y otras secuencias reguladoras que no aparecerán en el producto como se produce. En particular, los polipéptidos de fusión pueden incluir secuencias de activación, mediante las cuales, tras la escisión, el polipéptido resultante es un polipéptido activado de dos cadenas. Son las formas activadas de los polipéptidos que, en general, serán el producto farmacéutico administrado a un sujeto."

La forma activada de dos cadenas también se ejemplifica en detalle en Ejemplos, como los Ejemplos 1, 2 y 13. Por ejemplo, en el pliego de condiciones, párrafos [1067] y [1068], se dice:

La plasmina escinde selectivamente un solo enlace en u-PA de tipo silvestre y otros polipéptidos de fusión de u-PA que tienen la secuencia de activación de u-PA de tipo

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

silvestre para activar el zimógeno u-PA-HSA y formar una proteína de fusión u-PA-HSA de dos cadenas, unida a través de un disulfuro con el dominio de proteasa activa C-terminal unido al dominio u-PA N-terminal por un enlace disulfuro. Para estos experimentos, la construcción utilizada tiene la secuencia establecida en SEQ ID NO: 1015, que contiene el polipéptido u-PA modificado de SEQ ID NO: 21, excepto que el C122S, por numeración de quimotripsina, es C122C para proporcionar una cisteína libre, y la secuencia de señal (residuos 1-20 de SEQ ID NO: 1015) no está incluida. Después de la activación, el producto resultante tiene dos cadenas (con referencia a SEQ ID NO:1015): una cadena A que tiene residuos 21-178 y una cadena B que tiene residuos 179-1022, u-PA (residuos 179-431), enlazador (residuos 432-437) y HSA (residuos 438-1022). Las cadenas A y B están unidas por un enlace disulfuro entre C168 y C299 (correspondiente a C122 por numeración de quimotripsina).
En consecuencia, la antigua reivindicación 102 (nueva reivindicación 67) define estructuralmente la proteína de fusión según la reivindicación y sus características técnicas esenciales.

2.29 Así mismo, el examinador objeta la reivindicación 136 debido a que carece de claridad al caracterizar el dominio de proteasa con las SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO:987. Sin embargo, dichas secuencias corresponden a polipéptidos u-PA modificados completos y no solo al dominio de proteasa. Por ende, el examinado sugiere eliminar la expresión "o proteína de fusión comprende un dominio de proteasa" para corregir la falta de claridad de la redacción de la reivindicación 136.

El solicitante respetuosamente no está de acuerdo. Esto debido a que las SEQ ID NOs: 21 y 987 cada uno enumera dominios de proteasa polipeptídica u-PA modificada. Véanse, por ejemplo, las FIGs. 4A-4H. Por ejemplo, la FIG.4A es un esquema de la proteína de fusión de SEQ ID NO: 1010, que contiene un dominio Fc en el extremo C-terminal del dominio proteasa u-PA (SEQ ID NO: 21) y una secuencia de activación de furina, donde el disulfuro se une entre los dominios Fc para formar un dímero. La FIG.4B es un esquema de la proteína de fusión de SEQ ID NO: 1011, que contiene un dominio Fc en el extremo C- del dominio proteasa u-PA (SEQ ID NO: 987), y el N-terminal de u-PA y la secuencia de activación u-PA en el extremo N-terminal de la proteína, donde

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

el disulfuro se une entre los dominios Fc para formar un dímero. La reivindicación 136 proporciona la secuencia de los dominios proteasa del polipéptido u-PA modificado, de modo que la persona experta comprende la secuencia del polipéptido u-PA reivindicado.

2.30 Por otra parte, el examinador objeta las reivindicaciones 96,98, 99, 100, 105 y 107 debido a que reclaman SEQ ID NO que caracterizan las proteínas de fusión, sin embargo, no hacen referencia que polipéptido especifico comprenden con su respectivo SEQ ID NO.

El solicitante respetuosamente no está de acuerdo. En ese sentido desea aclara que la reivindicación 96 menciona los SEQ ID NO: 995-998, 1041 y 1044; La reivindicación 98 recita los SEQ ID NO: 1006, 1007, 1009 y 1010; la reivindicación 99 menciona los SEQ ID NO: 1004-1019 y 1034-1040; la reivindicación 100 menciona el número de identificación de la secuencia: 1015 o 1019; la reivindicación 105 menciona los SEQ ID NO: 1005, 1011, 1014, 1015, 1016, 1019 y 1036; y la reivindicación 107 reclama el número de identificación de la secuencia: 1015. Estos NO específicos de SEQ ID representan secuencias de proteínas de fusión completas consistentes con las proteínas de fusión descritas en las reivindicaciones de las que dependen. Por lo tanto, las reivindicaciones son claras porque los polipéptidos están completamente definidos y ejemplificados en la descripción.

2.31 Adicionalmente, el examinador objeta el capítulo reivindicatorio debido a que la referencia "o una porción catalíticamente activa del mismo" es considerada imprecisa ya que se reclama el polipéptido completo y no solo una porción catalíticamente activa de este. En ese sentido, el examinador sugiere eliminar dicha expresión del capítulo reivindicatorio.

El solicitante respetuosamente no está de acuerdo. Lo que se reivindica es un polipéptido u-PA modificado completo o una porción catalíticamente activa del mismo. No es necesario que el polipéptido sea el polipéptido completo para poseer la especificidad y la actividad de escisión de la proteína C3 del complemento. Un "fragmento catalíticamente activo de un polipéptido u-PA" se refiere al dominio

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

proteasa, o a cualquier fragmento o porción del mismo que conserve la actividad de la proteasa. El término se define en la aplicación y se conoce en el arte de las proteasas. No obstante, para avanzar en la tramitación de la solicitud, se modifican las reivindicaciones para suprimir de las reivindicaciones la mención de "una parte catalíticamente activa de la misma".

2.32 De manera similar, el examinador objeta el término "urocinasa" debido a que este carece de claridad porque el término correcto es "uroquinasa".

En este sentido, el solicitante ha decidido atender a la amable sugerencia del examinador y ha decidido reemplazar el término "urocinasa" por "uroquinasa". De ahí que es posible considerar superada la presente objeción.

2.33 Finalmente el examinador considera que el capítulo reivindicatorio presenta una excesiva complejidad, toda vez que reclama polipéptidos, proteínas de fusión entre otros con diferentes secuencias y permutaciones lo cual dificulta determinar el alcance de la invención que se busca proteger.

Las reivindicaciones se han modificado en su totalidad para reclamar claramente el tema. A la vista de las enmiendas y observaciones que se presentan en el presente documento, deben retirarse los rechazos por claridad.

En vista de lo anterior, las objeciones relacionadas con la claridad, la concisión y el soporte en la descripción del capítulo reivindicatorio, han quedado completamente superadas.

7. Descripción

El examinador indica que la descripción no divulga la materia reclamada de manera suficiente para que una persona normalmente versada en la materia pueda ejecutarla o reproducirla, por lo que no cumpliría con las disposiciones del Art. 28 de la Decisión Andina 486.

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

En este sentido, el examinador señala que la descripción no es clara y carece de suficiencia en la descripción para sustentar todas las posibles combinaciones del polipéptido con al menos 90% de identidad en relación con las SEQ ID NO: 1-6.

Por otra parte, el examinador objeta la tabla de la página 283 debido a que en cada proteína fusión se relaciona un rango de secuencias de dominio catalítico, de señal de secuencia y de compañero de fusión, lo que da lugar a un sin número de variantes estructurales que no están completamente sustentadas por la evidencia suministrada en la descripción.

Adicionalmente, el examinador considera que la que la referencia a que el polipéptido comprende "una o más" mutaciones. Sin embargo, la evidencia suministrada en la descripción no provee sustento para polipéptidos de menos de 6 mutaciones, ni tampoco deleciones e inserciones únicamente sustituciones.

Finalmente, se menciona que el capítulo descriptivo se menciona "urocinasa", sin embargo, la traducción correcta de dicho término es "uroquinasa".

El solicitante respetuosamente no está de acuerdo. Las tablas de polipéptidos u-PA modificados ejemplares con fusiones N-terminal o C-terminal que supuestamente tienen un gran número de posibilidades de las proteínas de fusión proporcionan diecisiete (17) ejemplos enumerados de polipéptidos modificados. Además, la aplicación proporciona cientos de ejemplos de trabajo que muestran el efecto de modificaciones particulares y combinaciones de modificaciones. A la vista de los cientos de ejemplos, una persona versada en la materia sabe qué modificaciones de aminoácidos, incluidas las sustituciones, inserciones y deleciones, aumentarán la actividad y/o la especificidad de C3, y cuáles no. Por lo tanto, no sería necesario que un experto en la materia explorara experimentalmente todas y cada una de las posibles secuencias o modificaciones descritas en la solicitud y, por lo tanto, no supondría una carga excesiva de ensayo y error.
No obstante, para avanzar en el enjuiciamiento, la reivindicación 1 se modifica para reclamar las modificaciones específicas enumeradas en la reivindicación 33 que se encuentran en polipéptidos para los que se proporcionan datos sobre la escisión de C3

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

en la descripción. Como se ha comentado anteriormente, el objeto de las reivindicaciones modificadas se refiere a los polipéptidos que son explorados por el solicitante en el pliego de condiciones. Por lo tanto, la descripción describe clara y suficientemente la invención tal como se reivindica con respecto a las modificaciones específicas en el polipéptido u-PA y su efecto sobre la escisión e inactivación de C3, y la descripción no proporcionaría una carga excesiva de prueba y error.

Finalmente, tal como se mencionó en la sección 3 del presente memorial, se ha decidido modificar la descripción con el fin de reemplazar el término "urocinasa" por "uroquinasa", de manera que se puede considerar superada la presente objeción.

De esta manera, la materia divulgada en la descripción ahora se relaciona de una manera más cercana con la materia definida en el capítulo reivindicatorio. Por lo tanto, la descripción proporciona toda la información necesaria para llevar a cabo la invención y cumple con los requisitos legales establecidos en la Decisión Andina 486.

8. Unidad de Invención

El examinador manifiesta que la solicitud no cumpliría con el requisito de unidad de invención, pues el elemento común a las distintas invenciones reclamadas, un polipéptido activador de plasminógeno tipo uroquinasa modificado (u-PA), habría sido anticipado por el documento US20060142195A1 y Tsuji et al., The effects of amino-acid mutations on specific interactions between urokinase-type plasminogen activator and its receptor: Ab initio molecular orbital calculations. De este modo, el examinador indica que la presente invención se refiere a 4 grupos inventivos distintos, los cuales corresponden a 4 variantes diferentes del Polipéptido activador de plasminógeno tipo uroquinasa modificado (u-PA).

En este sentido, el solicitante respetuosamente no está de acuerdo. Sin embargo, con el fin de cooperar en facilitar el proceso de examen de la solicitud, las reivindicaciones se han modificado para referirse a un polipéptido u-PA modificado que comprende la sustitución V41R, proteínas de fusión y composición que comprende el polipéptido u-PA modificado, de conformidad con lo establecido en el Grupo Inventivo 1.

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

De este modo, los anticuerpos reivindicados comparten un concepto común inventivo que no había sido revelado previamente en los documentos del arte previo, por lo que la solicitud cumple con los requerimientos establecidos en el Artículo 25 de la Decisión 486. Por lo tanto, respetuosamente solicito que se retire la objeción a este respecto.

9. Nivel inventivo

El examinador ha indicado que las reivindicaciones 1 a 121 y 131 a 137 carecerían de nivel inventivo en vista de las enseñanzas del documento D1 (US20060142195A1) y D2 (Prüfer, K., et al. Nature ACCESSION A0A2R9BBQ2, "The bonobo genome compared with the chimpanzee and human genomes").

Con respecto a lo anterior, me permito resaltar las disposiciones del artículo 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, que establecen que "*se considerará que la invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica*".

Lo anterior significa que el análisis de nivel inventivo **NO** es una comparación de los objetos de las anterioridades y la solicitud en estudio. Por el contrario, el análisis de nivel inventivo **debe demostrar** la obviedad de la invención y establecer cómo ésta no contiene un salto cualitativo, que demuestre su altura inventiva, teniendo en cuenta que se hace **necesario demostrar** que la invención analizada carece de nivel inventivo y hubiese sido obvia para una persona versada en la materia.

El análisis del examinador

El examinador señala que el documento D1 es considerado como el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 1, ya que divulga un polipéptido activador de plasminógeno tipo uroquinasa modificado (u-PA), que comprende una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en L420A,

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

L420E, S421G, S421E, P422A, P422G, P422E, F423A y F423E o una o más modificaciones seleccionadas de R275E, F305H o
A292S.

Ahora, es importante resaltar que el examinador reconoció que la principal diferencia entre el polipéptido reclamado en la reivindicación 1 y el documento D1 de la presente invención consiste en que el polipéptido no modificado tiene la SEQ ID NO: 1 a 6 y una o más modificaciones que son seleccionadas de V41R, R35Q, H37Y, Y40Q, D60aP, L97bA, T97aI y H99Q.

Sin embargo, se considera que tal diferencia no está asociada a un efecto técnico, ya que el examinador considera que no hay manera de relacionar el polipéptido no modificado que presente una o más de las modificaciones V41R, R35Q, H37Y, Y40Q, D60aP, L97bA, T97aI y H99Q con el efecto técnico que se espera demostrar. Además, el documento D1 ya divulga un polipéptido activador de plasminógeno tipo uroquinasa modificado (u-PA), que comprende una o más modificaciones de aminoácidos las cuales permiten una especificidad a fibrina 500 veces mayor que la uroquinasa silvestre.

Asimismo, el examinador menciona que el documento D2 ya divulgaba un polipéptido activador de plasminógeno tipo uroquinasa de bonono (accesión A0A2R9BBQ2 de UNIPROT) con secuencias de alrededor de 95 % de identidad con las SEQ ID NOs: 1, 2, 3 y 749 de la presente solicitud. Por lo tanto, el examinador considera que la persona normalmente versada en la materia estaría motivada a incluir las secuencias sugeridas para el polipéptido activador de uroquinasa de bonono del documento D2 en el polipéptido divulgado en el documento D1, haciendo que la materia reclamada fuese obvia.

<u>La materia reclamada es inventiva a la luz del arte previo citado</u>

El solicitante solicita respetuosamente la reconsideración del rechazo. En primer lugar, las modificaciones que se alegan están en u-PA, en contraste con algunas de las modificaciones en D1 que se encuentran en un activador tisular del plasminógeno (t-PA). En segundo lugar, las modificaciones reclamadas instantáneamente alteran la

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

especificidad del sustrato y la actividad de u-PA para escindir C3; los polipéptidos u-PA modificados reclamados no escinden la plasmina nativa del sustrato u-PA, sino que escinden la proteína C3 del complemento, en contraste con las modificaciones que aumentan la especificidad del polipéptido para la fibrina descritas en D1. En la aplicación instantánea, el polipéptido u-PA es un andamio para crear los polipéptidos declarados que escinden un sustrato objetivo, C3. No escinden el glinógeno, el objetivo nativo de U-PA; por lo tanto, cualquier modificación en D1 no es pertinente para las presentes alegaciones. D1 se ocupa de mejorar u-PA y t-PA para disolver coágulos, no de dirigirse a C3 para inhibir el complemento.

El examinador afirma que el problema técnico a resolver es determinar cómo modificar el péptido conocido en D1 para proporcionar otro péptido alternativo. Este no es el problema técnico que hay que resolver. El problema técnico a resolver por las presentes reivinidicaciones es proporcionar una terapéutica que escinda e inactive C3 para inhibir la actividad del complemento. El problema se resuelve modificando u-PA para alterar su especificidad de sustrato para eliminar su actividad nativa e introducir una nueva actividad. La aplicación proporciona polipéptidos que utilizan el polipéptido u-PA como andamio y proporciona polipéptidos que tienen actividad y/o especificidad para la proteína C3 del complemento. Ni D1 ni D2, individualmente o en cualquier combinación, revelan, enseñan o sugieren un polipéptido u-PA modificado con actividad y especificidad para C3.

Enseñanza de la referencia citada y diferencias con las presentes reivindicaciones

D1: Publicación de patentes de EE. UU. Nº 2006/142195

D1 modifica polipéptidos que son activadores del plasminógeno, para el tratamiento del accidente cerebrovascular mediante la alteración de la coagulación de la sangre, para reducir su neurotoxicidad. D1 enseña el uso y la producción de factores activadores del plasminógeno para el tratamiento del accidente cerebrovascular. D1 enseña que la activación del plasminógeno es catalizada por u-PA (activador del plasminógeno tipo uroquinasa) y t-PA (activador tisular del plasminógeno). D1 enseña reemplazos que hacen que u-PA sea una mejor enzima u-PA para su uso en el tratamiento de accidentes cerebrovasculares. D1 mejora la actividad nativa; la aplicación instantánea ablaciona la

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

actividad nativa No hay ninguna sugerencia de alterar la actividad o la especificidad de u-PA para escindir un sustrato completamente diferente, ni hay ninguna sugerencia de modificaciones que efectúen dicho cambio.

D1 enseña a modificar u-PA para mejorar su actividad para las actividades u-PA para su uso terapéutico para alterar la coagulación, no para ablacionar sus actividades y utilizarlo como un andamio en el que se introduce una nueva actividad. D1 enseña variantes de uroquinasa que se modifican para tener una mayor especificidad para la fibrina, en comparación con el fibrinógeno, lo que hace que el u-PA no sea neurotóxico para el tratamiento del accidente cerebrovascular. D1 no revela, enseña ni sugiere un u-PA modificado que tenga actividad y/o especificidad para escindir C3 con el fin de inhibir el complemento. No hay divulgación, enseñanza o sugerencia en D1 de un u-PA modificado que comprenda V41R, ni ninguna de las modificaciones citadas en las reivindicaciones dependientes, y que tenga actividad y/o especificidad para la proteína C3 del complemento. D1 no revela, enseña ni sugiere un polipéptido u-PA modificado en el que se ablague su actividad nativa. Los polipéptidos u-PA modificados, como en el caso afirmado, no tienen su actividad nativa y no se pueden utilizar para tratar accidentes cerebrovasculares alterando la actividad de coagulación.

D1 enseña que su uroquinasa modificada de SEQ ID NO:2 en la misma, que es diferente de la secuencia de u-PA establecida en la presente solicitud y que comprende sustituciones en las posiciones 420-423, lo que aumenta la actividad de activación del plasminógeno en presencia de fibrina. Las afirmaciones en D1 mencionan que la actividad del factor activador del plasminógeno modificado [u-PA] "aumenta en más de 650 veces en presencia de fibrina" en comparación con la uroquinasa de tipo silvestre. Esto contrasta con la aplicación instantánea en la que el u-PA modificado no reconoce el plasminógeno y se modifica para alterar su actividad y/o especificidad del sustrato de modo que escinde un sustrato objetivo, C3, y no escinde el plasminógeno del sustrato nativo. D1 no enseña ni sugiere modificar u-PA para eliminar su actividad.

D1 no enseña ni sugiere un u-PA modificado que tenga actividad y/o especificidad para C3, un sustrato completamente diferente en una vía completamente diferente. No hay ninguna enseñanza o sugerencia en D1 de un u-PA modificado que tenga alguna de las

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

modificaciones citadas y una mayor actividad/especificidad para una proteína del complemento que es C3, en comparación con un polipéptido u-PA no modificado. D1 no enseña ni sugiere un polipéptido u-PA modificado que tenga una actividad/especificidad reducida o nula para el sustrato nativo, el plasminógeno.

D1 enseña polipéptidos u-PA modificados que conservan la especificidad del sustrato de u-PA y tienen una mayor actividad para el sustrato nativo; D1 proporciona polipéptidos u-PA con sus propiedades nativas. En la presente aplicación, el polipéptido u-PA es un andamio sobre el que se confiere nueva actividad y especificidad de sustrato, para la proteína C3 del complemento; los polipéptidos reivindicados no reconocen el plasminógeno como sustrato. D1, por lo tanto, proporciona reemplazos de u-PA que no pueden y no sugieren ninguna de las modificaciones en los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados y reivindicados en la presente solicitud.

D1 enseña que una uroquinasa modificada de SEQ ID NO:2, que es diferente de la u-PA establecida en la presente solicitud, que comprende sustituciones en las posiciones 420-423, muestra un aumento en la actividad de activación del plasminógeno en presencia de fibrina. Las afirmaciones dicen que la actividad del factor activador del plasminógeno modificado [u-PA] "aumenta en más de 650 veces en presencia de fibrina" en comparación con la uroquinasa de tipo silvestre. Esto contrasta con la aplicación instantánea en la que u-PA se emplea como andamio para la modificación con el fin de alterar su actividad y especificidad del sustrato de modo que escinda un sustrato objetivo, C3, y no escinde el plasminógeno del sustrato nativo. Como se ha afirmado, los polipéptidos u-PA modificados al instante tienen una reducción sustancial de la actividad del plasminógeno en comparación con el polipéptido u-PA de SEQ ID NO:5 (el dominio de la proteasa con el sustituto de C122S). En la práctica, como se puede ver en los datos de la solicitud, los polipéptidos u-PA modificados tienen actividades para escindir C3 que son muchas veces, hasta 1000 veces o más que la actividad de u-PA no modificado para C3, y no escinden el plasminógeno.

D1 no menciona a C3 como un objetivo para u-PA. En D1 no se menciona el uso de u-PA, como un polipéptido u-PA modificado, para inhibir la activación del complemento. D1 no enseña ni sugiere ninguna de las modificaciones de aminoácidos o combinaciones

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

de modificaciones de aminoácidos identificadas en la presente aplicación, ni su impacto en la escisión de C3. D1 no menciona ninguna de las modificaciones de aminoácidos V41 o citadas, que incluyen modificaciones como R35, H37, Y40, D10a, L97b, T97a o H99 como residuo para aumentar la actividad y/o la especificidad de C3. D1 se refiere al aumento de la actividad de u-PA para su sustrato nativo, el plasminógeno, en presencia de fibrina. No hay ninguna sugerencia en D1 de ablar su actividad nativa y alterar su actividad/especificidad de sustrato para un sustrato no nativo, como C3.

No se menciona el complemento o C3 en D1. Las modificaciones de D1 aumentan la especificidad/actividad del sustrato para el sustrato nativo. D1 enseña reemplazos de aminoácidos en posiciones muy diferentes a las que se afirma instantáneamente que mejoran la actividad enzimática de la uroquinasa o fibrina. D1 no enseña ni sugiere un u-PA modificado que contenga ninguna de las modificaciones citadas en las reivindicaciones 1 o 2, por lo que D1 no puede y no enseña ni sugiere un u-PA modificado como se afirma que ha aumentado la actividad y/o la especificidad para C3. D1 no enseña ni sugiere un u-PA modificado que tenga alguna de las modificaciones citadas y una mayor actividad y/o especificidad para una proteína del complemento que sea C3, en comparación con el polipéptido u-PA no modificado establecido en cualquiera de los SEQ ID NO: 1-6 o un fragmento catalíticamente activo que no contenga las modificaciones.

D1 enseña variantes de uroquinasa con mayor actividad de fibrina, en comparación con fibrinógeno, para aumentar así la escisión del plasminógeno y disminuir la neurotoxicidad, para su uso en el tratamiento del accidente cerebrovascular. D1 no enseña ni sugiere la ablación de la actividad nativa de U-PA y la modificación de su especificidad de sustrato para que se escinda e inactive la proteína C3 del complemento con el fin de inhibir el complemento. Como se describe en la solicitud, la escisión de las proteínas del complemento, como la C3, es una diana para el tratamiento de trastornos que implican la activación del complemento, como la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE) y el retraso de la función del injerto (DGF). La solicitud muestra que las modificaciones enumeradas en las reivindicaciones aumentan significativamente la actividad de escisión de C3 en un sitio que la inactiva. D1 no enseña ni sugiere ninguna de las modificaciones reclamadas, ni los reemplazos particulares en el mismo,

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

ni su efecto sobre la actividad y/o especificidad para C3. Como se señaló anteriormente, todos los polipéptidos de la aplicación se seleccionaron por su capacidad para reconocer el sitio de escisión en C3.

D2: Prüfer et al. Naturaleza 2012:486; Artículo 527

D2 enseña la secuencia de aminoácidos del bonobo u-PA, que tiene similitud de secuencia con el polipéptido u-PA no modificado de SEQ ID NO: 1, e incluye un V41L. Es un u-PA de tipo silvestre. D2 no es pertinente para las presentes alegaciones. Se limita a describir una variante de especie de u-PA humano que contiene una L en el residuo 41 en lugar de V; Esta es una diferencia conservadora de aminoácidos. La valina y la leucina son aminoácidos alifáticos. Las declaraciones actuales requieren V41R (reemplazo del aminoácido alifático valina (V), con un aminoácido básico, arginina (R). En D2 no hay ninguna sugerencia de modificación de u-PA ni de sustitución de V41 por un aminoácido no conservativo, ni los efectos de la misma sobre la actividad de u-PA. No hay ninguna sugerencia en D2 de modificar u-PA para escindir e inactivar C3. Por lo tanto, D2 no cura las deficiencias en las enseñanzas de D1.

La combinación de enseñanzas de D1 y D2 no enseña, sugiere ni da lugar a ninguno de los polipéptidos reclamados en la presente invención.

No hay ninguna enseñanza en D1 o D2 que haya incluido V41R en un polipéptido de D1, ni tal reemplazo daría lugar a ningún polipéptido reivindicado, particularmente porque D1 está dirigido a t-PA modificado. No hay ninguna sugerencia en D1 y/o D2 de haber modificado t-PA (o u-PA) para escindir C3. Ninguna de las reivindicaciones pendientes ni las reivindicaciones modificadas propuestas se refieren a un polipéptido u-PA modificado que comprende V41L como único reemplazo.

El efecto técnico de los polipéptidos u-PA modificados que comprenden las modificaciones de aminoácidos establecidas en las reivindicaciones 1 y 2 para mejorar la actividad y/o especificidad del polipéptido u-PA para la escisión de C3 se demuestra a lo largo de la presente aplicación con más de 900 ejemplos de trabajo. En ninguna de las dos referencias se sugiere la existencia de las combinaciones de modificaciones

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

citadas en las reivindicaciones ni ninguna sugerencia de que se efectúen esas combinaciones de modificaciones. No se menciona la activación del complemento ni el C3 en ninguna de las referencias, ni la modificación de la especificidad del sustrato de U-PA para que escinda el C3 y no reconozca el plasminógeno, el sustrato nativo, por lo que tiene poca o ninguna actividad sobre el plasminógeno.

La descripción y los resultados mostrados en la solicitud y las reivindicaciones establecen modificaciones que dan lugar al reconocimiento del sitio de destino en C3. Esto no es correcto; mientras que los polipéptidos que contienen estos dominios de proteasa no son tan activos en la escisión de C3 como los otros enumerados en las reivindicaciones, los datos muestran que tienen actividad en la escisión de C3, y se identificaron por su capacidad para reconocer el sitio de escisión en C3. Sin embargo, los polipéptidos que comprenden estos dominios proteasa no están dentro del alcance de la reivindicación 1.

Los polipéptidos u-PA modificados que comprenden los SEQ ID NOs: 185, 188, 303, 641, 776 y 856 no se encuentran entre los reivindicados en la reivindicación independiente 1.

Efecto ventajoso de la materia divulgada en el capítulo reivindicatorio

Los polipéptidos u-PA modificados declarados instantáneamente muestran el efecto técnico de alterar la actividad/específica de u-PA para que se escindan e inactiven la proteína C3; el efecto técnico se demuestra mediante los datos de la aplicación. Una consideración de todos los ejemplos de trabajo de polipéptidos u-PA modificados que incluyen V41R en la reivindicación 1 muestra que estos reemplazos proporcionan actividad y especificidad para la escisión de la proteína C3 del complemento. En el ejemplo 13 se analizan los efectos de varios reemplazos.

Como se muestra en el Ejemplo 13, en las páginas 259-261, los reemplazos tienen los siguientes efectos:

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

- R35Q aumenta la actividad intrínseca anti-C3 (es decir, en tampón) en aproximadamente 2,7 veces y en aproximadamente 4,3 veces en presencia de un 80% de plasma humano;
- El H37Y aumenta la actividad anti-C3 en aproximadamente 2,4-2,5 veces en tampón y en presencia de un 80% de plasma humano;
- R37aE disminuye la actividad anti-C3 en relación con el residuo de tipo silvestre aproximadamente 3,2 veces; pero en presencia de un 80% de plasma humano, no tuvo ningún efecto sobre la actividad anti-C3 y, como parece contribuir, a aumentar la estabilidad del polipéptido (ver Tabla 17 y Tabla 23);
- V38E mejora la estabilidad de la proteína en tampón y humor vítreo y aumenta la actividad anti-C3 en el 80% del plasma humano en ~1,5 veces;
- T39Y aumenta la actividad intrínseca anti-C3 y la actividad anti-C3 en el 80% del plasma humano en aproximadamente 7,5-8,5 veces;
- V41R aumenta la actividad intrínseca anti-C3 y la actividad anti-C3 en el 80% del plasma humano en aproximadamente 25 - 27 veces;
- D10aP aumenta la actividad intrínseca anti-C3 y la actividad anti-C3 en el 80% del plasma humano en aproximadamente 1,2 -1,6 veces;
- Y60bQ disminuye la actividad intrínseca anti-C3 en aproximadamente 1,7 veces y disminuyó la estabilidad de la proteína en vítreo después de la incubación durante 7 días a 37 °C en ~1,4 veces; pero en presencia de un 80% de plasma humano, aumenta la actividad anti-C3 en aproximadamente 1,1 veces;
- T97aI aumenta la actividad intrínseca anti-C3 y la actividad anti-C3 en presencia de un 80% de plasma humano en aproximadamente 1,2 - 1,3 veces;
- L97bA aumenta la actividad anti-C3 en aproximadamente 6,4 - 8,2 veces en tampón y en un 80% en plasma humano;
- El H99Q aumenta la actividad anti-C3 en aproximadamente 2,9 - 4,8 veces en tampón y en un 80% en plasma humano; y
- Y149R disminuye la actividad anti-C3 en aproximadamente 1,6 - 2,1 veces en tampón y 80% en plasma humano.

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

-

La reivindicación 1 requiere que los polipéptidos u-PA modificados comprendan V41R y reclama combinaciones alternativas de modificaciones en los polipéptidos. V41R está en todas las combinaciones citadas, al igual que otras de las modificaciones enumeradas anteriormente.

La descripción muestra en los ejemplos de trabajo que los polipéptidos con una o más de las modificaciones de aminoácidos V41R en combinación con las modificaciones enumeradas en las reivindicaciones escinden la proteína C3 del complemento, y lo hacen con mayor actividad y/o especificidad que el u-PA no modificado. El u-PA no modificado (por ejemplo, SEQ ID NO:5) no escinde específicamente C3. No hay incertidumbre ni imprevisibilidad en los datos presentados en la solicitud; los datos muestran que u-PA puede modificarse para escindir C3. Los datos también muestran una reducción o eliminación en la capacidad de escindir la plasmina, el sustrato nativo. La descripción contiene datos de más de 900 polipéptidos u-PA modificados. Todos reconocen el sitio de escisión en C3 porque todos fueron aislados por un ensayo que captura polipéptidos que reconocen este sitio. La mayoría de los 900 escindidos C3 con alta actividad. El u-PA no modificado no escinde C3. Más de 400 polipéptidos u-PA modificados ejemplares con una EC50 inferior a 100 nM para la escisión de C3 que contienen las modificaciones enumeradas en la reivindicación 1. Otros tienen un ED50 más alto, pero aun así se escinden C3. Dado que las enzimas no se consumen en una reacción, el hecho de que el ED50 sea de 10 nM, 100 nM o más no es de gran importancia para el uso terapéutico, y todas las combinaciones de modificaciones citadas en las reivindicaciones (así como las combinaciones descritas en la solicitud) reconocen el sitio de escisión en C3, ablacionando así la actividad nativa de U-PA y proporcionando una terapéutica que puede utilizarse para inhibir el complemento a través de la escisión de C3.

La solicitud, por lo tanto, demuestra que u-PA con cualquiera de las modificaciones reivindicadas escinde C3. El u-PA no modificado no escinde C3, y el polipéptido u-PA modificado de D1 no solo no escindiría C3, sino que ha mejorado la actividad de escisión del sustrato nativo y se utiliza para tratar el accidente cerebrovascular alterando la coagulación, no inhibiendo el complemento.

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

Se evaluaron cientos de polipéptidos u-PA modificados por su actividad de escisión, incluidos más de 475, incluido el u-PA de tipo silvestre, sin escisión de hC3 (véase, por ejemplo, la Tabla 14). u-PA es una proteasa inespecífica; las modificaciones aumentan la especificidad (kcat/km) para C3 (véase, por ejemplo, la Tabla 14, reproducida a continuación). La ED50 (dosis efectiva) de los polipéptidos u-PA de tipo silvestre y modificados es la requerida para escindir el 50% del C3 en el plasma anticoagulado de "prueba". Los polipéptidos u-PA modificados con las modificaciones enumeradas en la Tabla 14 se comparan con el dominio de proteasa u-PA de tipo silvestre no modificado con la modificación C122S. La modificación C122S se introduce para evitar la agregación de proteínas y no afecta a la actividad de u-PA. Los estudios realizados en los ejemplos de trabajo comparan los polipéptidos u-PA modificados con los u-PA de tipo silvestre.
La ED50 (media dosis máxima efectiva (ED50) se refiere a la concentración de u-PA que produce una pérdida del 50% de C3) medida en las Tablas 14 y 19, reproducidas a continuación, son in vitro; la actividad del dominio proteasa u-PA que contiene el reemplazo C122S (SEQ ID NO:5) refleja el hecho de que u-PA no escinde C3 ni tiene especificidad para escindir C3.

El Ejemplo 7 muestra la selectividad de los polipéptidos u-PA modificados, que incluyen los reemplazos enumerados en la reivindicación 1, para la escisión de C3 en comparación con el u-PA no modificado (véase, por ejemplo, la Tabla 20). Los resultados de la Tabla 20, reproducidos a continuación, muestran que los polipéptidos u-PA modificados han disminuido significativamente la actividad enzimática del sustrato plasminógeno. Todos los polipéptidos u-PA modificados probados mostraron una disminución de ED_{50} y una disminución de kcat/Km en comparación con el dominio de proteasa u-PA de tipo silvestre con el reemplazo de C122S establecido en SEQ ID NO: 5.

Los polipéptidos u-PA modificados proporcionados en la Tabla B a continuación, que incluyen todos los polipéptidos u-PA citados en las reivindicaciones, tienen una actividad reducida y/o especificidad para el plasminógeno; y todos tienen aumentos muchas veces en especificidad y actividad en C3, y para inhibir la activación del complemento en comparación con el u-PA no modificado. La mayoría de los polipéptidos u-PA modificados probados escindieron la proteína C3 del complemento humano de manera

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

significativamente más eficiente (es decir, ED50 más baja) que el dominio de proteasa u-PA de tipo silvestre que contiene el reemplazo C122S; muchos con un ED50 por debajo de 100 nM. En el presente documento se reproducen los resultados ejemplares de las Tablas 14, 19 y 20 de la descripción relativa a las modificaciones de aminoácidos R35Q, V41R, H37Y, Y40Q, D10aP, L97bA, T97aI y H99Q con un ED50 inferior a 100 nM:

Tabla B. Polipéptidos u-PA modificados y actividad de escisión C3

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
5	u-PA (dominio proteasa) de tipo silvestre con C122S	N/A (>3500)	> 6000	1.54E+04
8	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	35.7	1028	4.03E+02
9	F30Y / R35W / R36H / H37E / V38E / T39W / Y40H / V41R / Y60bQ / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149K / M157K	29.8	257	<1.0E+01
10	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	5.33	195	
11	R35W / R36H / H37N / V38E / T39F / Y40F / V41R / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K / Q192H	22.8	208	
12	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	10.8	227	<1.0E+01

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
13	F30Y/R35W/R36H/H37N/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	15.7	220	
14	F30Y / R35W / R36H / H37P / V38E / T39Y / Y40F / V41R / Y60bS / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149K / M157K	10.6	185	
15	V38E / Y40Q / V41L / Y60bL / L97bA / H99Q / C122S	34.5		
18	R35Q / H37Y / R37aE / V38E / T39Y / V41R / D10aT / Y60bT / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	19.5	253	<1.0E+01
19	R35W / H37P / R37aN / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bL / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	8.13	318	
20	R35W / H37D / R37aP / V38E / T39W / V41R / Y60bA / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	16.6	196	<1.0E+01
21	R35Q / H37Y / R37aE / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bQ / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	24.5		
22	H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D10aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	51.1		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
23	R35Q / R37aE / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bQ / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	46.1		
24	R35Q / H37Y / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bQ / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	10.7		
25	R35Q / H37Y / R37aE / T39Y / V41R / D10aP / Y60bQ / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	56.2		
28	R35Q / H37Y / R37aE / V38E / T39Y / V41R / Y60bQ / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	29.8		
29	R35Q / H37Y / R37aE / V38E / T39Y / V41R / D10aP / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	10.6		
30	R35Q / H37Y / R37aE / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bQ / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	25.3		
32	R35Q / H37Y / R37aE / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bQ / T97aI / L97bA / C122S / Y149R	92.3		
33	R35Q / H37Y / R37aE / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bQ / T97aI / L97bA / H99Q / C122S	9.27		
34	Y40Q / V41L / Y60bL / L97bA / H99Q / C122S	23.9		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
35	V38E/Y40Q/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	60.2		
36	V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S	18.2		
37	V38E / Y40Q / V41L / Y60bL / H99Q / C122S	54.9		
38	V38E / Y40Q / V41L / Y60bL / L97bA / C122S	82.9		
39	Y40Q / V41L / L97bA / H99Q / C122S	35.2		
42	T39Y/V41R/L97bA/H99Q/C122S	49		
43	T39Y/V41R/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S	33.2		
44	T39Y/V41R/D10aP/L97bA/H99Q/C122S	58.2		
171	F30H / V38D / V41R / L97bA / H99Q / Y151L / M157K	30.6		
171	F30H / V38D / V41R / L97bA / H99Q / Y151L / M157K	42.8		
176	F30H / V38D / V41R / L97bA / H99Q / C122S / Y149N / Y151L / M157K	60.3		
184	F30H / V38D / V41R / L97bA / H99Q / C122S / Y151L / M157K / R217D	54		
198	I17V / F30Y / V38D / Y40H / V41R / L97bA / H99Q / C122S / M157K	66		
199	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149W/M157K	71.3		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
216	I17V / F30Y / R35Q / H37W / V38D / Y40H / V41R / Y60bN / L97bA / H99Q / C122S / Y149H / M157K	58.6		
217	F30Y / R35Q / H37W / V38D / Y40H / V41R / Y60bN / L97bA / H99Q / C122S / Y149H / M157K / T158A	18.3		
218	I17V / F30Y / R35Q / H37W / V38D / Y40H / V41R / Y60bN / L97bA / H99Q / C122S / Y149H / M157K / T158A	12		
219	I17V / F30Y / V38D / Y40H / V41R / L97bA / H99Q / C122S / M157K / T158A	21.6		
221	F30Y / R35Q / R36H / H37W / V38E / Y40H / V41R / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / M157K	18.6		
222	I17V / F30Y / R36H / V38E / Y40H / V41R / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / M157K	19.6		
223	I17V / F30Y / R35Q / R36H / H37W / V38E / Y40H / V41R / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / M157K	9.65		
224	F30Y / R36H / V38E / Y40H / V41R / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / M157K / T158A	12.9		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
225	I17V / F30Y / R35Q / R36H / H37W / V38E / Y40H / V41R / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / M157K / T158A	5.21		
226	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/ L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	59.9		
227	I17V / F30Y / V38D / Y40H / V41R / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K	94.8		
228	F30Y/R35Q/H37W/V38D/Y40H/V41R/ Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M 157K	88.8		
230	F30Y / R36H / V38E / Y40H / V41R / K61E / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / M157K	27.9		
231	F30Y / R36H / R37aH / V38E / Y40H / V41R / K61E / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / M157K	31.9		
232	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/K61E/ T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M 157K	58		
233	F30Y/R36H/R37aH/V38E/Y40H/V41R /K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y1 49R/M157K	70.3		
240	F30Y/R35Q/H37Y/V38D/Y40H/V41R/ Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M 157K	98.7		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
242	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/I65T/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	33.6		
243	F30Y/R36H/V38E/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	83.5		
249	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/I65T/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	54.1		
260	I17V / F30Y / R35W / R36H / H37E / V38E / T39W / Y40H / V41R / Y60bQ / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149K / M157K	11.9		
261	F30Y / R35W / R36Q / H37E / V38A / T39W / Y40H / V41R / Y60bQ / K61D / I65V / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149K / M157K	28.4		
262	F30Y / R35W / R36Q / H37E / V38E / T39W / Y40H / V41R / Y60bQ / K61L / I65V / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149K / M157K	24.4		
263	F30Y/R35W/R36A/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/K61D/I65R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	18.4		
264	F30Y / R35W / R36K / H37E / V38E / T39W / Y40H / V41R / Y60bQ / K61E / I65T / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149K / M157K	17.9		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
265	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	23.8		
267	V38E / Y40Q / V41Q / D10aP / Y60bL / L97bA / H99Q / C122S / Y149W	66		
268	V38E / Y40Q / V41L / D10aP / Y60bL / L97bA / H99Q / C122S / Y149W	40.4		
270	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/M157K	59.3		
271	R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	19.9		
272	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	4.68		
273	F30Y / R36H / V38E / Y40H / V41R / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K	35.7		
275	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R/M157K	6.24		
275	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R/M157K	13.7		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
276	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61R/K62R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	3.51		
277	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K82R/T97aI/L97bA/H99Q/K110aR/C122S/Y149R/M157K	2.47		
278	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K92R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	3.04		
279	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K92S/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	3.48		
280	F30Y / R35Y / R36H / H37K / V38E / T39F / Y40F / V41R / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K / K179R	2.49		
281	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/K179S	3.87		
282	F30Y / R35Y / R36H / H37K / V38E / T39F / Y40F / V41R / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K / K187S / K223S / K224Y	34.9		
283	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/M157K	8.6		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
284	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S	8.78		
285	F30Y / R35W / H37S / V38E / T39Y / Y40H / V41R / Y60bN / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	8.44		
286	F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/M157K	6.38		
287	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61S/K62S/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	4.75		
288	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K82S/T97aI/L97bA/H99Q/K110aS/C122S/Y149R/M157K	5.82		
289	F30Y / R35Y / R36H / H37K / V38E / T39F / Y40F / V41R / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K / K187R / K223R / K224R	18.9		
290	F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S	8.23		
291	R35W / H37P / R37aN / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bL / T97aI / L97bA / H99Q / C122S	4.38		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
292	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	20.7		
299	R35Q / H37Y / R37aE / V38D / T39Y / V41R / D10aP / Y60bQ / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	77.3		
300	R35Q / H37Y / V38E / T39Y / V41R / D10aP / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	14.7		
307	Y40Q/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	73		
311	T39L / Y40L / V41R / T97aI / L97bA / H99Q / C122S	23.7		
312	V38D/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	80.7		
313	V38D/T39L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	66.3		
315	V38D/T39L/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S	79		
324	H37G/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	32.1		
325	H37G/R37aD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	47.9		
326	H37G / R37aD / G37bD / T39H / V41R / Y60bK / T97aS / L97bR / H99E /	49		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
	C122S / Y151L / E175D / Q192T / R217E / K224R			
329	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	58.5		
330	H37G / R37aD / G37bD / V38F / T39H / V41R / Y60bK / L97bR / H99E / C122S / Y151L / E175D / Q192T / R217E / K224R	44.6		
335	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/R217E/K224R	11.5		
337	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E	56.4		
338	H37G / R37aD / V38F / T39H / V41R / Y60bK / L97bR / H99E / C122S / Y151L / E175D / Q192T / R217E / K224R	26.7		
339	H37G/R37aD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E	34.8		
340	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E	34.5		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
341	H37G / R37aD / V38F / T39H / V41R / Y60bK / L97bR / H99E / C122S / Y151L / E175D / Q192T / R217E	26.8		
346	Y40Q / V41L / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	24.1		
347	R37aE/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S	54.9		
348	R37aE/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	59.3		
349	Y40Q / V41L / Y60bE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	49.9		
350	Y40Q / V41L / Y60bT / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	31.6		
351	Y40Q / V41L / Y60bS / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	32.5		
356	R35K / Y40Q / V41L / Y60bE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	53.2		
357	R37aD / Y40Q / V41L / Y60bT / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	65.3		
358	R35S / Y40Q / V41L / Y60bT / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	52.4		
359	R37aE/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	81.5		
360	R35V / Y40Q / V41L / Y60bS / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	22.8		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
364	R35V / R37aE / V38E / Y40Q / V41L / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	23.5		
365	R35V / R37aE / V38E / Y40Q / V41L / Y60bS / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	54.6		
368	R35V / R37aE / V38E / Y40Q / V41L / Y60bS / T97aE / L97bA / H99Q / C122S	32.2		
369	V41R / L97bR / H99Q / C122S / Y151L / R217V	25.1		
370	V38D/V41R/H99Q/C122S/Y151L/R217V	29.1		
371	V38D/V41R/L97bR/C122S/Y151L/R217V	54.3		
372	R37aE / V38E / Y40Q / V41L / Y60bS / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	95		
373	R35V / V38E / Y40Q / V41L / Y60bS / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	14.4		
374	R35V / R37aE / Y40Q / V41L / Y60bS / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	81.4		
376	L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217V	72.3		
377	V38D/H99Q/C122S/Y151L/R217V	94.4		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
381	H99Q / C122S / Y151L / R217V	60.4		
382	V41R / H99Q / C122S / Y151L / R217V	16		
387	Y40H / V41Q / L97bG / H99Q / C122S / R217T	37.2		
389	Y40H / V41Q / L97bG / H99Q / C122S	78.4		
390	Y40H / V41T / L97bG / H99Q / C122S / R217T	50		
398	T39Y/V41R/D10aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S	31.4		
399	T39Y/V41R/L97bG/H99Q/C122S	36.8		
400	T39H/V41R/L97bG/H99Q/C122S	78.4		
401	T39W/V41R/L97bG/H99Q/C122S	29.7		
402	T39Y/V41R/Y60bQ/L97bG/H99Q/C122S	31.1		
403	T39Y/V41R/Y60bP/L97bA/H99Q/C122S	42.1		
404	T39Y/V41R/Y60bP/L97bG/H99Q/C122S	39.2		
417	V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/R217D	68.8		
436	V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L/Q192E/R217D	56.3		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
446	R36H / V38D / Y40F / V41R / D97E / A98G / T97adel / H99L / L97bdel / C122S / Y151L / Q192E / R217D	42.2		
466	R36H / G37cD / V38D / V41R / A96D / D97G / A98G / T97adel / H99L / L97bdel / C122S / M157T / R217D	75		
469	R36H / V38D / V41R / A96D / D97E / A98G / T97adel / H99L / L97bdel / C122S / T178S / R217D	17.5		
475	F30H / V38D / Y40F / V41R / L97bA / H99Q / C122S / Y151L / M157F	42.5		
481	F30H / V38D / V41R / L97bA / H99Q / C122S / Y151L / M157S	43.8		
484	F30H / V38D / V41R / L97bA / H99Q / C122S / Y151L / M157K	28.1		
485	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q /C122S	99.9		
486	F30H / V38D / V41R / A96G / L97bA / H99Q / C122S / Y151L / M157K	23.7		
487	F30H / G37bD / V38D / T39H / V41R / L97bA / H99Q / R110dH / C122S / Y151L / M157K / S240I	55.5		
494	F30Y/R35H/V38D/Y40H/V41R/T56A/ L97bA/H99Q/C122S/M157K	28.5		
495	F30Y / V38D / Y40H / V41R / L97bA / H99Q / C122S / M157K / T158A	33.5		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
496	F30Y / V38E / Y40H / V41R / T56A / L97bA / H99Q / C122S / M157K / K243M	31.9		
498	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/ L97bA/H99Q/C122S/M157K	40.5		
500	F30Y/R35H/V38D/T39S/Y40L/V41R/L 97bA/H99Q/C122S/T147S/M157K	84.7		
503	F30H / R36L / V38E / V41R / K82R / L97bA / H99Q / C122S / Y151L / M157K	29		
504	F30H / R35H / V38D / V41R / K61E / L97bA / H99Q / C122S / Y151L / M157K / R206H	35.4		
505	I17V / F30H / V38D / V41R / L97bA / H99Q / C122S / Y151L / M157K	22.2		
506	F30H / R35S / V38E / V41R / Y60bH / L97bA / H99Q / C122S / Y151L / M157K	50.1		
507	F30H / R36H / V38D / V41R / T56A / L97bA / H99Q / C122S / Y151L / M157K	40		
508	F30H / R35Q / H37T / V38D / V41R / L97bA / H99Q / C122S / Y149I / Y151L / M157K / R217D	93.6		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
509	F30H / R35Q / H37W / V38D / V41R / D10aE / Y60bS / L97bA / H99Q / C122S / Y149L / Y151L / M157K	40.8		
510	F30H / R35Q / H37Q / V38D / V41R / A96D / L97bA / H99Q / C122S / Y149L / Y151L / M157K / R217D	96.8		
511	F30H / R35H / H37I / V38D / V41R / L97bA / H99Q / C122S / Y149W / Y151L / M157K / R217S	30.6		
513	F30H / R35Q / H37W / V38D / V41R / L97bA / H99Q / C122S / Y151L / M157K	14.7		
514	F30H / R35L / H37D / V38D / V41R / L97bA / H99Q / C122S / Y151L / M157K / R217E	21.8		
515	F30H / R35Q / H37T / V38D / V41R / L97bA / H99Q / C122S / Y151L / M157K	28.9		
516	F30H / R35Q / V38D / V41R / L97bA / H99Q / C122S / Y151L / M157K	32		
517	F30H / R35Q / H37W / V38D / V41R / D10aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149L / Y151L / M157K / R217D	36.4		
518	F30H / R35Q / V38D / V41R / Y60bE / L97bA / H99Q / C122S / Y149N / Y151L / M157K	66.3		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
519	F30Y / R35Q / V38D / Y40H / V41R / L97bA / H99Q / C122S / Y149W / M157K / R217D	58.8		
520	F30Y / R35Q / H37W / V38D / Y40H / V41R / Y60bN / L97bA / H99Q / C122S / Y149H / M157K	78.3		
523	F30Y/R35H/V38D/Y40H/V41R/L97bA /H99Q/C122S/M157K	87.3		
534	R35S / V38D / L97bA / H99Q / C122S / Y151L / M157Y	49.8		
535	F30H / V38D / V41R / L97bA / H99Q / C122S / Y151L / M157T	52.9		
538	F30Y/V38D/Y40F/V41L/L97bA/H99Q/ C122S/Y151L/M157R	20.2		
541	F30H / V38D / L97bA / H99Q / C122S / Y151L / M157K	94.2		
542	N26D / F30Y / V38D / Y40H / V41R / I65T / L97bA / H99Q / C122S / M126I / M157K	93.2		
543	F30Y / V38D / Y40L / V41R / L97bA / H99Q / C122S / Y151L / M157K / Q192H	42.4		
544	F30Y / V38D / Y40L / V41Q / L97bA / H99Q / C122S / Y151L / M157R / Q192Y	88.1		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
545	F30Y / V38D / Y40L / V41R / L97bA / H99Q / C122S / Y151L / M157A / Q192Y	51.5		
547	F30H / V38D / V41Q / L97bA / H99Q / C122S / Y151L / M157R	91.3		
550	F30Y/R36H/V38D/Y40H/V41R/L97bA /H99L/C122S/F141L/M157K/T158A	38.5		
551	F30Y/R35H/V38D/Y40H/V41R/L97bA /H99Q/C122S/I138V/M157K	33.1		
552	T22I / F30Y / R35S / V38D / Y40H / V41R / L97bA / H99Q / C122S / I138V / M157K	42.9		
553	F30Y/R36S/V38D/T39I/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/S146P/M157K/T158S	54.6		
555	F30Y/R35L/V38D/Y40H/V41R/L97bA/ H99Q/C122S/M157K	65.1		
557	F30Y / R35L / V38D / Y40H / V41R / L97bA / H99Q / C122S / M157K / T158A	11.3		
561	F30Y / R35L / V38D / Y40H / V41R / N76S / L97bA / H99Q / C122S / M157K / K187E	43.6		
562	F30Y / R35H / V38D / Y40H / V41R / L97bA / H99Q / C122S / M157K / T158S	26.3		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
564	F30H / V38D / V41R / L97bA / H99Q / C122S / Y151L / M157K / Q192H / R239H	85.7		
565	F30H / R35Q / H37Y / V38D / V41R / D10aE / Y60bN / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / Y151L / M157K	71.4		
576	F30Y / R35T / H37T / V38D / Y40H / V41R / D10aP / Y60bD / L97bA / H99Q / C122S / Y149T / M157K	94.7		
584	F30Y / R36H / V38E / Y40H / V41R / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149N / L150V / M157K	49.3		
586	F30Y / R36H / V38E / Y40H / V41R / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / S146F / M157K / Q192H / K243Q	24.1		
587	F30Y / R36H / V38E / Y40H / V41R / K61E / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149H / M157K / K187R	57.7		
591	F30Y/R36H/H37S/V38E/T39L/Y40H/V41R/Y60bH/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	67.5		
592	F30Y / R35L / R36H / H37D / V38E / T39W / Y40H / V41R / Y60bA / T97aD / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K	77.9		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
594	F30Y/R36H/H37E/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	96.3		
595	F30Y/R36H/H37G/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149Q/M157K	44.6		
597	F30Y/R36H/H37F/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bD/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	16.8		
598	F30Y / R36H / H37N / V38E / T39Y / Y40H / V41R / Y60bQ / T97aV / L97bA / H99Q / C122S / Y149L / M157K	51.4		
600	F30Y/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bV/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	63.9		
601	F30Y/R36H/H37A/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	46.9		
603	F30Y/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bN/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	56		
604	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bS/T97aL/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	18		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
605	F30Y/R36H/V38E/T39V/Y40H/V41R/Y60bH/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149S/M157K	99.7		
606	F30Y / R36H / H37E / V38E / T39F / Y40H / V41R / Y60bN / T97aV / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K	56.4		
607	F30Y/R36H/H37G/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aA/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	64.2		
608	F30Y / R35I / R36H / H37E / V38E / T39Y / Y40H / V41R / Y60bS / T97aV / L97bA / H99Q / C122S / Y149L / M157K	36.9		
611	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	12.7		
612	F30Y / R35W / R36H / H37Q / V38E / T39H / Y40H / V41R / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149L / M157K	30.3		
613	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	7.64		
614	F30Y/R35V/R36H/H37G/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bW/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149E/M157K	3.47		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
615	F30Y/R35M/R36H/H37G/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bP/T97aF/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	11.7		
616	F30Y/R35V/R36H/H37G/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	8.3		
617	F30Y / R35V / R36H / H37S / V38E / T39F / Y40H / V41R / Y60bS / T97aM / L97bA / H99Q / C122S / Y149W / M157K	10.2		
618	F30Y / R35W / R36H / H37D / V38E / T39Y / Y40H / V41R / Y60bT / T97aD / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K	41.3		
619	F30Y/R35L/R36H/H37G/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149M/M157K	22.1		
620	F30Y/R35F/R36H/H37G/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bS/T97aD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	36.7		
621	F30Y/R35V/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149E/M157K	25.4		
623	F30Y/R35V/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	22.6		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
624	F30Y/R35V/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	9.54		
625	F30Y / R35V / R36H / H37G / V38E / T39L / Y40H / V41R / Y60bT / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K / Q192T / R239H	60.1		
627	F30Y / R35W / R36H / H37D / V38E / T39F / Y40H / V41R / Y60bE / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K	15.4		
628	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	13.5		
629	F30Y / R35W / R36H / H37E / V38E / T39Y / Y40H / V41R / Y60bD / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K / Q192M	70.8		
633	F30Y/R35Y/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	10.8		
645	R35W / H37D / V38D / T39Y / V41R / Y60bS / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	37.4		
647	R35Q / H37N / V38D / T39Y / V41R / Y60bP / L97bA / H99Q / C122S	45.4		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
648	R35W / H37D / V38D / T39Y / V41R / Y60bH / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	44.2		
650	R35V / R36H / H37D / V38E / T39W / Y40M / V41R / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K	13.1		
651	F30Y / R35L / R36H / H37D / V38E / T39Y / Y40F / V41R / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K / Q192N	80.9		
653	F30H / R35Q / R36H / H37Y / V38E / T39Y / Y40L / V41R / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K	17.8		
656	R35Q / R36H / H37Y / V38E / T39Y / Y40L / V41R / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K	7.33		
657	F30Y / R35L / R36H / H37E / V38E / T39N / Y40F / V41R / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K	29.6		
658	F30Y/R35I/R36H/H37D/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	14.1		
661	F30H / R35L / R36H / H37E / V38E / T39F / Y40F / V41R / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K	70.4		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
663	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	45.8		
664	F30Y/R35W/R36H/H37E/S37dP/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	16.8		
665	I24T / F30Y / R35W / R36H / H37E / V38E / T39W / Y40H / V41R / Y60bQ / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149K / M157K	20.6		
666	I24N / F30Y / R35W / R36H / H37E / V38E / T39W / Y40L / V41R / Y60bQ / N87D / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149K / M157K	18.2		
667	F30Y / R35W / R36H / H37S / V38E / Y40H / Y60bN / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K	48.6		
668	F30Y/R35W/H37Y/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	4.92		
669	F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	6.35		
670	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	8.44		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
671	R35Y/R36H/H37S/V38D/T39Y/V41R/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	27.3		
672	R36H / H37S / V38E / T39W / V41R / Y60bN / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	54.1		
673	R35W / R36H / H37S / V38E / T39Y / V41R / Y60bN / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K	34		
674	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/Y40H/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	15.1		
675	R35W / R36N / H37S / V38E / T39Y / Y40M / V41R / Y60bN / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157S	5.52		
676	R35W / R36Q / H37S / V38T / T39Y / Y40H / V41R / Y60bN / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / Y151P / M157R	4.78		
677	F30Y/R35W/R36Q/H37S/V38P/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157R	7.55		
678	R35W / R36Q / H37S / V38P / T39Y / V41R / Y60bN / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / Y151L	2.38		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
679	F30H / R35W / R36T / H37S / V38P / T39Y / V41R / Y60bN / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / Y151L / M157S	7.59		
680	F30Y / R35W / R36Q / H37S / V38E / T39Y / Y40L / V41R / Y60bN / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / Y151L / M157T / Q192H	12.4		
681	F30Y / R35W / R36K / H37S / V38D / T39Y / Y40L / V41R / Y60bN / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / Y151L / M157R / Q192T	15.9		
682	R35W / R36K / H37S / V38E / T39Y / Y40L / V41R / Y60bN / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / Y151L / M157S / Q192H	5.01		
683	F30Y/R35W/R36S/H37S/V38Q/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S/Q192N	8.86		
684	F30Y / R35W / R36Q / H37S / V38T / T39Y / Y40L / V41R / Y60bN / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / Y151L / M157K / Q192T	11.8		
685	R35W / R36K / H37S / V38A / T39Y / V41R / Y60bN / T97aE / L97bA / H99Q	13.3		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
	/ C122S / Y149R / Y151L / M157R / Q192T			
686	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151P/M157K/Q192H	41		
687	R35W / R36Q / H37S / V38E / T39Y / Y40L / V41R / Y60bN / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / Y151L / M157S / Q192T	19		
688	R35W / R36Q / H37S / V38S / T39Y / V41R / Y60bN / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / Y151L / M157S / Q192H	8.04		
689	F30H / R35W / R36H / H37S / V38E / T39Y / Y40M / V41R / Y60bN / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K	13		
690	F30Y / R35W / R36T / H37S / V38S / T39Y / Y40L / V41R / Y60bN / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / Y151L / M157R / Q192Y	4.47		
692	F30Y / R35V / R36H / H37T / V38E / T39A / Y40L / V41Q / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K	53.7		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
693	F30Y/R35K/R36H/H37E/R37aK/V38E/T39F/Y40F/V41R/D10aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	28.1		
694	F30Y / R35Q / R36H / H37G / R37aE / V38E / T39Y / Y40F / V41R / D10aP / Y60bG / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K	28.3		
695	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39I/Y40F/V41R/D10aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149M/M157K	69.2		
696	F30Y / R35H / R36H / H37D / R37aE / V38E / T39Y / Y40F / V41R / D10aP / Y60bD / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K	33.4		
697	H37M / R37aD / V38E / T39A / V41R / D10aP / Y60bS / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	42.7		
698	R35F / H37D / R37aS / V38E / T39Y / V41R / D10aE / Y60bD / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	63.4		
699	R35A / H37D / R37aN / V38E / T39F / V41R / D10aP / Y60bD / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	65.8		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
700	R35Q / H37D / R37aA / V38E / T39F / V41R / D10aP / Y60bE / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	80.7		
701	R35W / H37D / R37aP / V38E / T39W / V41R / D10aR / Y60bS / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	11.8		
702	R35F / H37D / R37aN / V38E / T39Y / V41R / Y60bS / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	30.9		
703	R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D10aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	10.3		
704	R35Q / H37Y / R37aD / V38E / T39L / V41R / D10aE / Y60bT / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	29.4		
705	R35W / H37P / R37aG / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bE / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	7.4		
706	N26D / F30Y / R35Y / R36H / H37E / V38E / T39F / Y40F / V41R / K61E / T97aI / L97bA / H99Q / R110dS / P114S / C122S / Y149R / M157K	10.3		
707	F30Y / R35Y / R36H / H37N / V38E / T39F / Y40F / V41R / K61E / R72H / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K / Q169K	7.64		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
708	F30Y / R35Y / R36H / H37E / V38E / T39F / Y40F / V41R / K61E / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K / T242A	11.1		
709	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39F/Y40F/V41R/D10aS/Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	55.3		
710	F30Y/R35M/R36H/H37D/R37aD/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D10aP/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	41.2		
711	F30Y / R35Q / R36H / H37G / R37aN / V38E / T39Y / Y40F / V41R / Y60bA / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K	66.2		
712	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D10aP/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	38.6		
713	F30Y/R35W/R36H/H37D/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D10aE/Y60bF/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	21.8		
714	F30Y/R35Q/R36H/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D10aS/Y60bP/T97	18.1		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
	aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K			
715	F30Y/R35Q/R36H/H37Y/R37aD/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bV/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	30.4		
716	F30Y / R35A / R36H / H37T / R37aD / V38E / T39Y / Y40L / V41R / D10aP / Y60bE / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K	80.7		
717	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/N145S/S146V/T147M/D148G/Y149Q/L150F/M157K	13.6		
718	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39F/Y40F/V41R/D10aP/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	38.2		
719	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aL/V38E/T39N/Y40F/V41R/D10aP/Y60bT/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	59.9		
720	F30Y / R35E / R36H / H37D / R37aN / V38E / T39Y / Y40F / V41R / Y60bN / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K	40		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
721	F30Y/R36H/H37M/R37aD/V38E/T39G/Y40F/V41R/D10aP/Y60bE/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	85.9		
722	F30Y/R35W/R36H/H37E/R37aP/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149Q/M157K	47.7		
724	F30Y/R35Y/R36H/H37P/R37aQ/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bH/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	11.3		
725	F30Y / R35F / R36H / H37D / R37aD / V38E / T39H / Y40F / V41R / D10aP / Y60bA / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K	71.3		
726	F30Y/R35Q/R36H/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D10aE/Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	29.3		
727	F30Y/R35W/R36H/H37P/R37aD/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D10aE/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	8.9		
728	F30Y / R35Q / R36H / H37G / R37aE / V38E / T39Y / Y40F / V41R / D10aA / Y60bS / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K	38.5		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
729	F30Y / R35M / R36H / H37G / R37aE / V38E / T39Y / Y40F / V41R / D10aP / Y60bS / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K	22.9		
731	F30Y / R35W / R36H / H37P / R37aQ / V38E / T39Y / Y40F / V41R / Y60bQ / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K	7.52		
732	F30Y / R35W / R36H / H37P / R37aE / V38E / T39Y / Y40F / V41R / Y60bA / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R / M157K	10.3		
733	R35Q / H37Y / R37aE / V38E / T39Y / V41R / D10aA / Y60bP / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	17.4		
734	R35L / H37D / R37aS / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bD / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	42.9		
735	R35M / H37G / R37aD / V38E / T39W / V41R / D10aP / Y60bD / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	42.3		
736	R35Q / H37G / R37aP / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bE / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	29.2		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
737	R35A / H37G / R37aE / V38E / T39F / V41R / D10aE / Y60bP / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	51.1		
738	R35Q / H37S / R37aE / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bS / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	26.3		
740	R35Q / H37G / R37aE / V38E / T39H / V41R / D10aP / Y60bA / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	80.1		
741	R35W/H37D/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D10aE/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	26.9		
742	R35Q / H37G / R37aE / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bT / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	40.9		
743	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D10aG/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	18.1		
744	R35W / H37P / R37aN / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bL / D97T / T97aE / L97bG / A98S / H99L / C122S	6.17		
745	R35W / H37P / R37aN / V38E / T39Y / V41K / D10aP / Y60bD / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y151L / Q192A	14.8		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
746	R35Y/H37V/R37aW/V38E/T39Y/V41R/D10aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192T	11.6		
747	R35W / H37P / R37aN / V38E / T39Y / V41K / D10aP / Y60bD / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y151L / Q192T	21.7		
748	H37T / R37aL / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bD / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y151L / Q192R	47.9		
749	R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D10aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L	0.92		
750	R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D10aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192H	5.26		
751	R35A / H37E / R37aG / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bD / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y151L	4.76		
752	R35W / H37G / R37aE / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bD / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y151L / Q192T	8.07		
753	R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D10aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	6.24		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
754	R35A / H37T / R37aD / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bD / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y151L / Q192S	25.5		
792	R35Q / H37Y / R37aP / V38E / T39Y / V41R / D10aQ / Y60bP / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	5.14		
793	R35N / H37S / R37aE / V38E / T39F / V41R / D10aP / Y60bE / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	59.5		
794	R35H / H37P / R37aG / V38E / T39F / V41R / D10aP / Y60bE / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	12.6		
795	R35Q / H37G / R37aD / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bA / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	27.1		
796	R35L / H37D / R37aN / V38E / T39Y / V41R / D10aP / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	10.4		
797	R35N / H37T / R37aY / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bE / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	28.7		
798	R35Q / H37D / R37aK / V38E / T39F / V41R / D10aP / Y60bS / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	27.1		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
799	R35Q / H37Y / R37aS / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bE / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	8.95		
800	R35Q / H37Y / R37aP / V38E / T39Y / V41R / D10aN / Y60bN / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	14.5		
801	R35Q / H37S / R37aP / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bE / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	33.8		
802	R35Y/H37D/V38E/T39W/V41R/D10aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	5.57		
807	V38E / T39L / V41R / D10aP / Y60bD / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149V / Y151L / Q192T	71.1		
818	V38D/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	32		
820	V38D/V41Q/D10aP/Y60bS/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192Y/R217E/K224R	96.4		
821	V38D/V41R/Y60bR/T97aW/L97bR/H99E/C122S/E175D/R217E/K224R	14.8		
822	V38D/V41R/Y60bS/T97aI/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192F/R217E/K224R	42.1		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
826	V38D / V41Q / Y60bR / T97aW / L97bR / H99E / C122S / Y151L / E175D / Q192T / R217E / K224R	90		
827	V38D/V41L/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217Q	36.2		
829	R37aS / V38D / V41Q / L97bG / H99Q / C122S / Y151L / R217T	27.9		
830	V38D/V41R/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217A	17.7		
831	V38D/V41R/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217E	9.09		
832	R35Q / V38D / V41R / T97aS / L97bA / H99Q / C122S / Y151L	24.8		
833	V38D/V41Q/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217T	68.6		
834	R35Q / V38D / V41R / L97bG / H99Q / C122S / Y151L	22.9		
835	R35S / V38D / V41R / L97bA / H99Q / C122S / Y151L	25.7		
836	R35S / V38D / V41L / L97bG / H99Q / C122S / Y151L / R217Q	26.1		
839	R35K / V38D / Y40H / V41R / Y60bS / L97bG / H99Q / C122S	75.6		
841	R35S / V38D / Y40H / V41L / Y60bD / L97bG / H99Q / C122S	61.5		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
849	V38D/V41R/Y60bR/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	66.2		
855	V38D/V41R/Y60bR/L97bR/H99L/C122S/Y151L/E175D/Q192Y/R217E/K224R	94.9		
868	V38D/T39W/Y40L/V41R/T97aL/L97bA/H99Q/C122S	48.9		
869	V38D/T39F/Y40L/V41R/T97aW/L97bA/H99Q/C122S	37.8		
870	V38D/T39Y/Y40Q/V41L/T97aY/L97bA/H99Q/C122S	51.7		
871	R37aS / V38D / T39Y / Y40M / V41R / T97aL / L97bA / H99Q / C122S	81.2		
872	V38D/T39L/Y40L/V41R/T97aV/L97bA/H99Q/C122S	41.6		
873	V38D/T39L/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	38.2		
874	V38D/T39L/Y40L/V41R/T97aW/L97bA/H99Q/C122S	49.1		
875	V38D/T39Y/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	30.7		
876	V38D/T39Y/Y40L/V41R/T97aW/L97bA/H99Q/C122S	38.4		
877	V38D/T39Y/Y40M/V41R/T97aW/L97bA/H99Q/C122S	50.1		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
878	V38D/T39Y/Y40L/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S	37.8		
879	V38D/T39Y/Y40M/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S	45		
881	V38D/V41R/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217E	31.5		
882	V38D/V41R/L97bR/H99E/C122S/Y151L/R217E	11.4		
884	V38D/V41R/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217V	33.7		
886	V38D/T39Y/Y40L/V41K/L97bR/H99L/C122S/E175D	91.8		
891	H37A / R37aE / V38F / T39L / V41Q / Y60bR / T97aW / L97bR / H99E / C122S / Y151L / E175D / Q192T / R217E / K224R	99.6		
893	R35G / H37T / R37aE / V38T / T39Y / V41Q / Y60bR / T97aF / L97bR / H99E / C122S / Y151L / E175D / Q192T / R217E / K224R	69.7		
900	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	50.9		
901	R35Q / H37G / R37aE / V38Y / T39H / V41R / Y60bK / T97aS / L97bR /	67.6		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
	H99E / C122S / Y151L / E175D / Q192T / R217E / K224R			
902	R35K/H37A/R37aE/V38H/T39Y/V41R /Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y 151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	55.9		
903	R35Q / H37G / R37aE / V38Y / T39F / V41R / Y60bK / T97aS / L97bR / H99E / C122S / Y151L / E175D / Q192T / R217E / K224R	60.1		
904	R35Q / H37G / R37aE / V38W / T39Y / V41R / Y60bK / T97aS / L97bR / H99E / C122S / Y151L / E175D / Q192T / R217E / K224R	44.6		
924	R36S / V38D / T39L / Y40L / V41R / L97bI / H99E / C122S / R217T	31.5		
925	R37aS / V38D / T39Y / Y40F / V41R / H99L / C122S / R217T	49.9		
926	V38D/T39Y/Y40L/V41R/L97bI/H99E/ C122S/R217E	12.8		
932	R37aS / V38D / T39Y / V41R / L97bI / H99E / C122S / R217T	70.1		
934	R35S / R37aD / V38E / Y40Q / V41L / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	37.2		
935	R35V / R37aD / V38E / Y40Q / V41L / Y60bG / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	63.5		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
936	R35S / R37aD / V38E / Y40Q / V41L / Y60bV / T97aL / L97bA / H99Q / C122S / Y149L	31.5		
937	R37aP / V38E / Y40Q / V41L / Y60bE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	67.2		
938	R35M / R37aQ / V38E / Y40Q / V41L / Y60bE / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	81.6		
939	R35S / R37aD / V38E / Y40Q / V41L / Y60bT / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	93.5		
940	R35S / R37aA / V38E / Y40Q / V41L / L97bA / H99Q / C122S / Y149V	30.2		
942	R35V / R37aE / V38E / Y40Q / V41L / Y60bS / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	51.7		
943	R35A / R37aE / V38E / Y40Q / V41L / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	35.9		
944	R37aD/V38E/Y40Q/V41L/Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	91.9		
946	R35A / R37aD / V38E / Y40Q / V41L / Y60bV / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149K	93.4		
947	R37aD/V38E/Y40Q/V41L/Y60bP/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149K	64.8		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
948	R35S / R37aD / V38E / Y40Q / V41L / T97aE / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	32.2		
949	R37aS / V38E / Y40V / V41R / H99L / C122S / Y151L / R217V	9.04		
950	V38E / Y40L / V41R / H99L / C122S / Y151L / R217S	16.1		
951	R36L / V38E / Y40Q / V41R / L97bG / H99Q / C122S / Y151P / R217S	63.7		
953	V38E / Y40A / V41L / L97bG / H99Q / C122S / R217T	20.4		
954	V38E / Y40H / V41Q / L97bG / H99Q / C122S / R217T	51.6		
955	V38E / Y40H / V41T / L97bG / H99Q / C122S / R217T	67.8		
956	V38E / Y40Q / V41L / L97bG / H99Q / C122S / Y151P / R217T	16.4		
957	V38E / Y40Q / V41L / L97bG / H99Q / C122S / R217T	14.5		
958	R36S / V38E / Y40Q / V41R / L97bG / H99L / C122S / Y151P / R217E	34.3		
959	V38E / Y40P / V41L / L97bG / H99L / C122S / Y151Q / R217E	16		
960	R37aS / V38E / Y40H / V41T / L97bG / H99Q / C122S / R217T	72.6		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
961	R37aS / V38E / Y40P / V41L / L97bG / H99Q / C122S / Y151Q / R217T	23.4		
963	R36S / V38E / Y40L / V41N / L97bG / H99Q / C122S / Y151L / R217T	29.6		
972	V38E/T39W/V41R/D10aP/Y60bD/L97bA/H99L/C122S	33.5		
973	V38E/T39Y/V41R/D10aW/Y60bP/L97bR/H99I/C122S	16.4		
975	V38E/T39L/V41R/D10aN/Y60bP/L97bG/H99Q/C122S	46.8		
977	V38E/T39W/V41R/D10aW/Y60bP/L97bG/H99L/C122S	4.94		
978	R35H / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bQ / L97bA / H99Q / C122S / I138V / E167K	12.1		
979	R35H / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bQ / L97bA / H99Q / C122S / T158S / E167K	10.6		
980	R35H / G37bD / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bQ / L97bA / H99Q / C122S / T158S	12.4		
981	R35H / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bQ / L97bA / H99Q / C122S / T158A	7.23		

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

SEQ ID NO	Cadena de mutación	Tabla 14 ED_{50} (nM)	Tabla 19 ED_{50} Plasma humano al 80% (60 min, nM)	Tabla 20 kcat/km (M-1S-1)
982	R35H / V38E / T39Y / V41R / T56A / D10aP / Y60bQ / L97bA / H99Q / C122S	19.9		
983	R35H / V38E / T39Y / V41R / T56S / D10aP / Y60bQ / L97bA / H99Q / C122S / T158S	14.6		
984	R37aH / V38E / T39Y / V41R / T56A / D10aP / Y60bQ / L97bA / H99Q / C122S / T158A	28.8		
985	R37aH / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bQ / L97bA / H99Q / C122S	90.7		
986	R35H / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bQ / P60cS / L97bA / H99Q / C122S / I138V / E167K	19.4		

La actividad de escisión C3 de los polipéptidos u-PA modificados también se probó en humor vítreo de mono cynomolgus. Como se detalla en la solicitud y se establece en las reivindicaciones, los polipéptidos u-PA modificados se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades y trastornos oculares y/u oftálmicos, como, por ejemplo, la DMAE. Los resultados del Ejemplo 4, que se exponen en la Tabla 16, que se reproduce a continuación, muestran que los polipéptidos u-PA modificados, que contienen todas las modificaciones de aminoácidos enumeradas en las reivindicaciones, escindieron la proteína C3 del complemento con un número de recambio (por hora) más alto que el polipéptido u-PA de referencia que contiene el reemplazo C122S establecido en el SEQ ID NO: 5. La Tabla 16, con las modificaciones de aminoácidos establecidas en la reivindicación independiente 2 en negrita, se reproduce a continuación como Tabla C:

Tabla C. Polipéptidos u-PA modificados y escisión C3 en humor vítreo

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

Tabla 16: Clivaje C3 en humor vítreo		
Numeración de quimotripsina	NÚMERO DE ID DE SECUENCIA *	Número de facturación C3 (hr-1)
u-P u-PA de tipo silvestre con C122S	5	0.3
V38E / Y40Q / V41L / Y60bL / L97bA / H99Q / C122S	15	29
R35Q / H37Y / R37aE / V38E / T39Y / V41R / D10aP / Y60bQ / T97aI / L97bA / H99Q / C122S / Y149R	21	48
Y40Q/V41L/L97bA/C122S	40	8
Y40Q / V41L / Y60bL / L97bA / H99Q / C122S	34	42
V38E/Y40Q/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	35	17
V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S	36	56
V38E / Y40Q / V41L / Y60bL / H99Q / C122S	37	18
V38E / Y40Q / V41L / Y60bL / L97bA / C122S	38	12
R37aS/V41R/L97bG/H99Q/C122S	41	5
T39Y/V41R/L97bA/H99Q/C122S	42	17
T39Y/V41R/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S	43	26
T39Y/V41R/D10aP/L97bA/H99Q/C122S	44	17

Los datos también muestran que los polipéptidos u-PA modificados seleccionados para la escisión de C3 han reducido significativamente la actividad de un sustrato nativo. El efecto técnico de los polipéptidos u-PA modificados que comprenden las modificaciones de aminoácidos establecidas en las reivindicaciones 1 y/o 2 para mejorar la actividad y/o la especificidad del polipéptido u-PA para la escisión de C3 se demuestra a lo largo de la solicitud.

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

Por ejemplo, en el Ejemplo 12, se probó la eficiencia catalítica para la activación de Glu-plasminógeno por WT y variantes anti-C3 de polipéptidos U-PA. El ejemplo 12 muestra que los polipéptidos u-PA modificados que comprenden V38D/L97bA/H99Q/C122S, F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K, y C[4]S/F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bH/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192A tenían varios kcat/KM de tipo silvestre en comparación con el u-PA de tipo silvestre que comprende C122S. Los datos de estos experimentos también demostraron que las proteínas variantes de u-PA anti-C3 mostraron una actividad significativamente reducida hacia el plasminógeno, un sustrato fisiológicamente relevante de u-PA de tipo silvestre. En combinación con los datos del Ejemplo 7, estos datos demuestran que los polipéptidos u-PA anti-C3 modificados muestran no sólo una actividad sustancialmente mayor hacia un sustrato "nuevo", C3, sino también una actividad sustancialmente reducida hacia el plasminógeno, el sustrato fisiológico normal de los u-PA de tipo silvestre.

Además de los datos expuestos anteriormente, el Ejemplo 13, discutido anteriormente, analiza la contribución de cada modificación de aminoácidos en la actividad de C3 y otras propiedades. El ejemplo 13 muestra la contribución de cada modificación a la escisión de C3. Para demostrar el efecto de cada modificación en la actividad de escisión, cada modificación se reemplaza con el residuo de tipo silvestre, y se evalúa la actividad del polipéptido modificado resultante y se compara con el polipéptido u-PA modificado con las 13 modificaciones (establecidas en SEQ ID NO: 21). Todas las modificaciones (SEQ ID NO: 21) dan como resultado un polipéptido que tiene una alta actividad de escisión de C3; el polipéptido u-PA de SEQ ID NO:21 tiene un ED50 para la escisión de C3 de 19 nM, en comparación con 3380 nM para el u-PA de tipo silvestre. A cada polipéptido adicional ensayado se le ha eliminado una de las 13 modificaciones y la actividad se compara con el polipéptido con todas las modificaciones para determinar la contribución de cada modificación a la reducción de ED50 de todos los reemplazos. El cambio en la actividad refleja la contribución de cada una de las modificaciones a la actividad de escisión (u otras propiedades del polipéptido u-PA modificado); Esto proporciona una evaluación precisa del efecto de cada modificación en la actividad de escisión.

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

La solicitud proporciona cientos de ejemplos de polipéptidos u-PA modificados que contienen uno o más de los reemplazos enumerados en la reivindicación 1, incluidas las combinaciones de modificaciones de aminoácidos enumeradas en las reivindicaciones independientes, que muestran que estos reemplazos aumentan significativamente la actividad de escisión de C3 en un sitio que lo inactiva, y en particular entre los aminoácidos 740 y 741; el efecto técnico de los polipéptidos reivindicados instantáneamente se muestra a lo largo de la solicitud. en los cientos de ejemplos de polipéptidos u-PA modificados que contienen una o más de las modificaciones de aminoácidos enumeradas en la reivindicación 1 que han aumentado la actividad y/o la especificidad para C3. D1 y D2 no enseñan ni sugieren ninguna de estas modificaciones, solas o en combinación, ni ninguna de estas propiedades, ni el efecto sorprendente e inesperado sobre la actividad de escisión de C3 y/o la especificidad de C3. D1 y D2 no enseñan ni sugieren ninguna de estas posiciones para el reemplazo, ni los reemplazos particulares, ni su efecto sobre la actividad y/o especificidad para C3. D1 y D2 no enseñan ni sugieren ninguna de las combinaciones de modificaciones reclamadas, ni sus efectos sobre la actividad y/o especificidad para C3. Como se describe en la solicitud, la escisión de las proteínas del complemento, como la C3, es una diana para el tratamiento de trastornos como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) y el retraso de la función del injerto (DGF).

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, queda claro que las características técnicas de la materia definida en el capítulo reivindicatorio presentado junto al presente memorial no se derivan de manera obvia o evidente de las enseñanzas de D1 y D2. Por lo tanto, el objeto reclamado cumple con el requisito de Nivel inventivo establecido en el Art. 18 de la Decisión 486.

10. Conclusión

Con las modificaciones introducidas y los argumentos presentados puede concluirse que:

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

i) El nuevo título de la solicitud es claro y se relaciona con el objeto reclamado, cumpliendo así con el literal d) del artículo 27 de la Decisión 486 de 2000;
ii) El nuevo pliego reivindicatorio se ajusta a las disposiciones del Artículo 34 de la Decisión 486/00;
iii) La invención de la presente solicitud es clara y cuenta con el debido sustento en el capítulo descriptivo, a la vez que se encuentra divulgada de manera suficientemente completa, cumpliendo así con los requerimientos de los Artículos 30 y 28 de la Decisión 486;
iv) La presente invención se relaciona con materia susceptible de patentabilidad, cumpliendo así con los requerimientos del Artículo 14 de la Decisión 486;
v) La presente invención se relaciona con un único concepto inventivo, cumpliendo así con los requerimientos del Artículo 25 de la Decisión 486;
vi) La invención de la presente solicitud no resulta obvia ni se derivada de manera evidente del estado de la técnica, cumpliendo así con los requerimientos del Artículo 18 de la Decisión 486.

Por tanto, atentamente me permito solicitar a ese Despacho otorgar el privilegio de patente solicitado a la solicitud en estudio, toda vez que cumple a cabalidad con los requerimientos de la Decisión 486 de 2000.

Asimismo, respetuosamente solicito 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.

11. Anexos

- Nuevo capítulo reivindicatorio conformado por ciento dos (102) reivindicaciones.
- Descripción modificada
- Recibo de pago por concepto de modificaciones a las reivindicaciones.

Señora Directora,

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24



CAROLINA DAZA MONTALVO
C.C. 66.783.790 de Palmira Valle
TP-141563 CSJ
notificaciones@clarkemodet.com.co

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de activador de plasminógeno tipo uroquinasa modificado (u-PA), que comprende, en un polipéptido de u-PA no modificado, la modificación V41R, y hasta 17 modificaciones adicionales, en donde:

las modificaciones de aminoácidos se seleccionan entre reemplazos, inserciones y deleciones en la secuencia primaria del polipéptido de u-PA modificado;

el polipéptido de u-PA modificado escinde la proteína de complemento C3 para inhibir o reducir de este modo la activación de complemento;

los residuos se numeran por numeración de quimotripsina;

el polipéptido de u-PA no modificado consiste en la secuencia expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-6, o una porción catalíticamente activa del polipéptido de SEQ ID NO: 1, 3, 4 y 6 que contiene el dominio de proteasa expuesto en SEQ ID NO: 2 o 5;

las modificaciones adicionales en el polipéptido modificado consisten en, por numeración de quimotripsina, cualquiera de:

R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L;

R35W/R36Q/H37S/V38P/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K82R/T97aI/L97bA/H99Q/K110aR/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/K179R;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K92R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35V/R36H/H37G/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bW/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149E/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K92S/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61R/K62R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/K179S;

R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/T97aI/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35W/R36T/H37S/V38S/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157R/Q192Y;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61S/K62S/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35A/H37E/R37aG/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L;

R35W/R36Q/H37S/V38T/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151P/M157R;

F30Y/R35W/H37Y/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

V38E/T39W/V41R/D60aW/Y60bP/L97bG/H99L/C122S;

R35W/R36K/H37S/V38E/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S/Q192H;

R35Q/H37Y/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aQ/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

I17V/F30Y/R35Q/R36H/H37W/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A;

R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192H;

F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35W/R36N/H37S/V38E/T39Y/Y40M/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157S;

R35Y/H37D/V38E/T39W/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K82S/T97aI/L97bA/H99Q/K110aS/C122S/Y149R/M157K;

R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/D97T/T97aE/L97bG/A98S/H99L/C122S;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R/M157K;

R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

R35H/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158A;

R35Q/R36H/H37Y/V38E/T39Y/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35W/H37P/R37aG/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

V38D/V41Q/D60aH/Y60bS/T97aW/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/R217E/K224R;

F30Y/R35W/R36H/H37P/R37aQ/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/

Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36Q/H37S/V38P/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157R;

F30H/R35W/R36T/H37S/V38P/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S;

F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37N/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61E/R72H/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q169K;

R35W/R36Q/H37S/V38S/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S/Q192H;

R35W/H37G/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192T;

R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35V/R36H/H37G/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35W/R36S/H37S/V38Q/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S/Q192N;

F30Y/R35W/R36H/H37P/R37aD/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aE/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35Q/H37Y/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R37aS/V38E/Y40V/V41R/H99L/C122S/Y151L/R217V;

V38D/V41R/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217E;

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35V/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

I17V/F30Y/R35Q/R36H/H37W/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

F30Y/R35V/R36H/H37S/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bS/T97aM/L97bA/H99Q/C122S/Y149W/

M157K;

R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

N26D/F30Y/R35Y/R36H/H37E/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/R110dS/P114S/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37P/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35L/H37D/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35W/R36H/H37P/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R35H/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158S/E167K;

R35Q/H37Y/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35Y/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37E/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/T242A;

F30Y/R35L/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A;

F30Y/R35Y/R36H/H37P/R37aQ/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bH/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

V38D/V41R/L97bR/H99E/C122S/Y151L/R217E;

H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/R217E/K224R;

R35Y/H37V/R37aW/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192T;

F30Y/R35M/R36H/H37G/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bP/T97aF/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36Q/H37S/V38T/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157K/Q192T;

R35W/H37D/R37aP/V38E/T39W/V41R/D60aR/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

I17V/F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

I17V/F30Y/R35Q/H37W/V38D/Y40H/V41R/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K/T158A;

R35H/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/I138V/E167K;

F30Y/R35W/R36Q/H37S/V38E/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157T/Q192H;

R35H/G37bD/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158S;

R35H/H37P/R37aG/V38E/T39F/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

V38D/T39Y/Y40L/V41R/L97bI/H99E/C122S/R217E;

F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A;

F30H/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40M/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35V/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40M/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35W/R36K/H37S/V38A/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157R/Q192T;

F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/N145S/S146V/T147M/D148G/Y149Q/L150F/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R/M157K;

F30Y/R35I/R36H/H37D/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35V/V38E/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R35Q/H37Y/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aN/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

V38E/Y40Q/V41L/L97bG/H99Q/C122S/R217T;

R35H/V38E/T39Y/V41R/T56S/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158S;

F30H/R35Q/H37W/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K;

R35Q/H37Y/V38E/T39Y/V41R/D60aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41K/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192A;

V38D/V41R/Y60bR/T97aW/L97bR/H99E/C122S/E175D/R217E/K224R;

F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/Y40H/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

V38D/V41L/Y60bP/T97aM/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/R217E/K224R;

F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37N/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

F30Y/R35W/R36K/H37S/V38D/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157R/Q192T;

V41R/H99Q/C122S/Y151L/R217V;

V38E/Y40P/V41L/L97bG/H99L/C122S/Y151Q/R217E;

V38E/Y40L/V41R/H99L/C122S/Y151L/R217S;

V38E/Y40Q/V41L/L97bG/H99Q/C122S/Y151P/R217T;

V38E/T39Y/V41R/D60aW/Y60bP/L97bR/H99I/C122S;

R35W/H37D/R37aP/V38E/T39W/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R36H/H37F/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bD/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37E/S37dP/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aA/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R36H/V38D/V41R/A96D/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/T178S/R217D;

V38D/V41R/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217A;

F30H/R35Q/R36H/H37Y/V38E/T39Y/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36K/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/K61E/I65T/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bS/T97aL/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K;

F30Y/R35Q/R36H/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aS/Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aG/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

I24N/F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40L/V41R/Y60bQ/N87D/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35Q/H37W/V38D/Y40H/V41R/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K/T158A;

F30Y/R35W/R36A/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/K61D/I65R/T97aE/L97bA/H99Q/C1

22S/Y149K/M157K;

F30Y/R35Q/R36H/H37W/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/K187R/K223R/K224R;

R35W/R36Q/H37S/V38E/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S/Q192T;

R35H/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/P60cS/L97bA/H99Q/C122S/I138V/E167K;

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aT/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

I17V/F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35H/V38E/T39Y/V41R/T56A/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/V38D/Y40F/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157R;

V38E/Y40A/V41L/L97bG/H99Q/C122S/R217T;

I24T/F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

I17V/F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A;

R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41K/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192T;

F30H/R35L/H37D/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K/R217E;

F30Y/R35W/R36H/H37D/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aE/Y60bF/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35L/R36H/H37G/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149M/M157K;

I17V/F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K;

F30Y/R35V/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35W/R36H/H37N/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192H;

R35V/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35M/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C

122S/Y149R/M157K;

R35Q/V38D/V41R/L97bG/H99Q/C122S/Y151L;

R37aS/V38E/Y40P/V41L/L97bG/H99Q/C122S/Y151Q/R217T;

R35V/R37aE/V38E/Y40Q/V41L/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30H/V38D/V41R/A96G/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K;

T39L/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K

Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/S146F/M157K/Q192H/K243Q

Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35W/R36Q/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/K61L/I65V/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R35Q/V38D/V41R/T97aS/L97bA/H99Q/C122S/Y151L;

V41R/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217V;

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35V/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149E/M157K;

R35A/H37T/R37aD/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192S;

R35S/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L;

R35S/V38D/V41L/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217Q;

F30Y/R35H/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158S;

R35Q/H37S/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

H37G/R37aD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R;

H37G/R37aD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E;

R35W/H37D/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aE/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R35Q/H37G/R37aD/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R35Q/H37D/R37aK/V38E/T39F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R35Y/R36H/H37S/V38D/T39Y/V41R/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

R37aS/V38D/V41Q/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217T;

F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K;

F30Y/R35K/R36H/H37E/R37aK/V38E/T39F/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bG/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36Q/H37E/V38A/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/K61D/I65V/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

F30Y/R35H/V38D/Y40H/V41R/T56A/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

R35N/H37T/R37aY/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R37aH/V38E/T39Y/V41R/T56A/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158A;

F30H/R35Q/H37T/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K;

F30H/R36L/V38E/V41R/K82R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K;

V38D/V41R/H99Q/C122S/Y151L/R217V;

R35Q/H37G/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35Q/R36H/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aE/Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35Q/H37Y/R37aD/V38E/T39L/V41R/D60aE/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35L/R36H/H37E/V38E/T39N/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R36S/V38E/Y40L/V41N/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217T;

T39W/V41R/L97bG/H99Q/C122S;

F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R35S/R37aA/V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y149V;

F30Y/R35W/R36H/H37Q/V38E/T39H/Y40H/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K;

F30Y/R35Q/R36H/H37Y/R37aD/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bV/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/Y151L/M157K;

F30H/R35H/H37I/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149W/Y151L/M157K/R217S;

V38D/T39Y/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S;

R35F/H37D/R37aN/V38E/T39Y/V41R/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

T39Y/V41R/Y60bQ/L97bG/H99Q/C122S;

T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S;

V38D/V41R/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217E;

R36S/V38D/T39L/Y40L/V41R/L97bI/H99E/C122S/R217T;

R35S/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/Y60bV/T97aL/L97bA/H99Q/C122S/Y149L;

Y40Q/V41L/Y60bT/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/V38E/Y40H/V41R/T56A/L97bA/H99Q/C122S/M157K/K243M;

F30Y/R36H/R37aH/V38E/Y40H/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

F30H/R35Q/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K;

V38D/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R;

H37G/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R;

R35S/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R35V/R37aE/V38E/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S;

Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35H/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/I138V/M157K;

T39Y/V41R/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35H/R36H/H37D/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A;

V38E/T39W/V41R/D60aP/Y60bD/L97bA/H99L/C122S;

F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/I65T/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

V38D/V41R/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217V;

R35Q/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R36S/V38E/Y40Q/V41R/L97bG/H99L/C122S/Y151P/R217E;

V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S;

H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R2

17E;

H37G/R37aD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/K187S/K223S/K224Y;

Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S;

F30H/R35H/V38D/V41R/K61E/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K/R206H;

F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35A/R37aE/V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

V38D/V41L/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217Q;

F30H/R35Q/H37W/V38D/V41R/D60aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/Y151L/M157K/R217D;

F30Y/R35F/R36H/H37G/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bS/T97aD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

T39Y/V41R/L97bG/H99Q/C122S;

F30Y/R35I/R36H/H37E/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bS/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K;

R35S/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

Y40H/V41Q/L97bG/H99Q/C122S/R217T;

R35W/H37D/V38D/T39Y/V41R/Y60bS/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

V38D/T39F/Y40L/V41R/T97aW/L97bA/H99Q/C122S;

V38D/T39Y/Y40L/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39F/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

V38D/T39L/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S;

V38D/T39Y/Y40L/V41R/T97aW/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R36H/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99L/C122S/F141L/M157K/T158A;

F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aA/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

T39Y/V41R/Y60bP/L97bG/H99Q/C122S;

F30H/R36H/V38D/V41R/T56A/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K;

F30Y/R35E/R36H/H37D/R37aN/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

V38E/Y40Q/V41L/D60aP/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S/Y149W;

F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

F30H/R35Q/H37W/V38D/V41R/D60aE/Y60bS/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/Y151L/M157K;

R35Q/H37G/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151P/M157K/Q192H;

F30Y/R35M/R36H/H37D/R37aD/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bT/T97aD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

V38D/T39L/Y40L/V41R/T97aV/L97bA/H99Q/C122S;

V38D/V41R/Y60bS/T97aI/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192F/R217E/K224R;

T39Y/V41R/Y60bP/L97bA/H99Q/C122S;

R36H/V38D/Y40F/V41R/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L/Q192E/R217D;

R35M/H37G/R37aD/V38E/T39W/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/V38D/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K/Q192H;

F30H/V38D/Y40F/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157F;

H37M/R37aD/V38E/T39A/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/Y151L/M157K;

T22I/F30Y/R35S/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/I138V/M157K;

R35L/H37D/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35L/V38D/Y40H/V41R/N76S/L97bA/H99Q/C122S/M157K/K187E;

F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157S;

R35W/H37D/V38D/T39Y/V41R/Y60bH/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R36H/H37G/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149Q/M157K;

R35Q/H37G/R37aE/V38W/T39Y/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R;

H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R;

V38D/T39Y/Y40M/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S;

R35Q/H37N/V38D/T39Y/V41R/Y60bP/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

R35Q/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

V38E/T39L/V41R/D60aN/Y60bP/L97bG/H99Q/C122S;

F30Y/R36H/H37A/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37E/R37aP/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149Q/M157K;

H37T/R37aL/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192R;

H37G/R37aD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R;

F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/Y40H/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

V38D/T39W/Y40L/V41R/T97aL/L97bA/H99Q/C122S;

H37G/R37aD/G37bD/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R;

T39Y/V41R/L97bA/H99Q/C122S;

V38D/T39L/Y40L/V41R/T97aW/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149N/L150V/M157K;

R35S/V38D/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157Y;

R37aS/V38D/T39Y/Y40F/V41R/H99L/C122S/R217T;

Y40Q/V41R/L97bA/C122S, y

cualquiera de estos polipéptidos en los que C122S no está modificado y es C122C, por numeración de quimotripsina.

2. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 1, en donde el polipéptido de u-PA no modificado consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-6.

3. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 1, en donde el

polipéptido de u-PA no modificado consiste de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5.

4. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el polipéptido de u-PA modificado tiene ED_{50} para escisión de inactivación de C3 de menos de o 100 nM en un ensayo *in vitro*.

5. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 4, en donde:

el polipéptido comprende las modificaciones en el dominio de proteasa seleccionado de:

R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L;

R35W/R36Q/H37S/V38P/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K82R/T97aI/L97bA/H99Q/K110aR/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/K179R;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K92R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35V/R36H/H37G/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bW/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149E/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K92S/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61R/K62R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/K179S;

R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/T97aI/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35W/R36T/H37S/V38S/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157R/Q192Y;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61S/K62S/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35A/H37E/R37aG/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L;

R35W/R36Q/H37S/V38T/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151P

/M157R;

F30Y/R35W/H37Y/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

V38E/T39W/V41R/D60aW/Y60bP/L97bG/H99L/C122S;

R35W/R36K/H37S/V38E/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S/Q192H;

R35Q/H37Y/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aQ/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

I17V/F30Y/R35Q/R36H/H37W/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A;

R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192H;

F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35W/R36N/H37S/V38E/T39Y/Y40M/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157S;

R35Y/H37D/V38E/T39W/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K82S/T97aI/L97bA/H99Q/K110aS/C122S/Y149R/M157K;

R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/D97T/T97aE/L97bG/A98S/H99L/C122S;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R/M157K;

R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

R35H/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158A;

R35Q/R36H/H37Y/V38E/T39Y/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35W/H37P/R37aG/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

V38D/V41Q/D60aH/Y60bS/T97aW/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/R217E/K224R;

F30Y/R35W/R36H/H37P/R37aQ/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36Q/H37S/V38P/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157R;

F30H/R35W/R36T/H37S/V38P/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S;

F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37N/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61E/R72H/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q169K;

R35W/R36Q/H37S/V38S/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S/Q192H;

R35W/H37G/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192T;

R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35V/R36H/H37G/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35W/R36S/H37S/V38Q/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S/Q192N;

F30Y/R35W/R36H/H37P/R37aD/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aE/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35Q/H37Y/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R37aS/V38E/Y40V/V41R/H99L/C122S/Y151L/R217V;

V38D/V41R/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217E;

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35V/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

I17V/F30Y/R35Q/R36H/H37W/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

F30Y/R35V/R36H/H37S/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bS/T97aM/L97bA/H99Q/C122S/Y149W/M157K;

R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

N26D/F30Y/R35Y/R36H/H37E/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/R110dS/P114S/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37P/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y

149R/M157K;

R35L/H37D/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35W/R36H/H37P/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R35H/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158S/E167K;

R35Q/H37Y/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35Y/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37E/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/T242A;

F30Y/R35L/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A;

F30Y/R35Y/R36H/H37P/R37aQ/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bH/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

V38D/V41R/L97bR/H99E/C122S/Y151L/R217E;

H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/R217E/K224R;

R35Y/H37V/R37aW/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192T;

F30Y/R35M/R36H/H37G/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bP/T97aF/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36Q/H37S/V38T/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157K/Q192T;

R35W/H37D/R37aP/V38E/T39W/V41R/D60aR/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

I17V/F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

I17V/F30Y/R35Q/H37W/V38D/Y40H/V41R/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K/T158A;

R35H/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/I138V/E167K;

F30Y/R35W/R36Q/H37S/V38E/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157T/Q192H;

R35H/G37bD/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158S;

R35H/H37P/R37aG/V38E/T39F/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

V38D/T39Y/Y40L/V41R/L97bI/H99E/C122S/R217E;

F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A;

F30H/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40M/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35V/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40M/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35W/R36K/H37S/V38A/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157R/Q192T;

F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/N145S/S146V/T147M/D148G/Y149Q/L150F/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R/M157K;

F30Y/R35I/R36H/H37D/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35V/V38E/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R35Q/H37Y/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aN/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

V38E/Y40Q/V41L/L97bG/H99Q/C122S/R217T;

R35H/V38E/T39Y/V41R/T56S/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158S;

F30H/R35Q/H37W/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K;

R35Q/H37Y/V38E/T39Y/V41R/D60aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

V38D/V41R/Y60bR/T97aW/L97bR/H99E/C122S/E175D/R217E/K224R;

F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37N/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

F30Y/R35W/R36K/H37S/V38D/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157R/Q192T;

V41R/H99Q/C122S/Y151L/R217V;

V38E/Y40L/V41R/H99L/C122S/Y151L/R217S;

V38E/T39Y/V41R/D60aW/Y60bP/L97bR/H99I/C122S;

R35W/H37D/R37aP/V38E/T39W/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R36H/H37F/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bD/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37E/S37dP/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aA/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R36H/V38D/V41R/A96D/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/T178S/R217D;

V38D/V41R/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217A;

F30H/R35Q/R36H/H37Y/V38E/T39Y/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36K/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/K61E/I65T/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bS/T97aL/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K;

F30Y/R35Q/R36H/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aS/Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

I24N/F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40L/V41R/Y60bQ/N87D/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

F30Y/R35Q/H37W/V38D/Y40H/V41R/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K/T158A;

F30Y/R35W/R36A/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/K61D/I65R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

F30Y/R35Q/R36H/H37W/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/K187R/K223R/K224R;

R35W/R36Q/H37S/V38E/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S/Q192T;

R35H/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/P60cS/L97bA/H99Q/C122S/I138V/E167K;

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aT/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

I17V/F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35H/V38E/T39Y/V41R/T56A/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S;

I24T/F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

I17V/F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A;

F30H/R35L/H37D/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K/R217E;

F30Y/R35W/R36H/H37D/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aE/Y60bF/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35L/R36H/H37G/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149M/M157K;

I17V/F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K;

F30Y/R35V/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35W/R36H/H37N/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192H;

F30Y/R35M/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35Q/V38D/V41R/L97bG/H99Q/C122S/Y151L;

F30H/V38D/V41R/A96G/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K;

T39L/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K

F30Y/R35W/R36Q/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/K61L/I65V/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R35Q/V38D/V41R/T97aS/L97bA/H99Q/C122S/Y151L;

V41R/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217V;

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35V/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149E/M157K;

R35A/H37T/R37aD/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192S;

R35S/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L;

R35S/V38D/V41L/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217Q;

F30Y/R35H/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158S;

R35Q/H37S/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

H37G/R37aD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R;

H37G/R37aD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E;

R35W/H37D/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aE/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R35Q/H37G/R37aD/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R35Q/H37D/R37aK/V38E/T39F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R35Y/R36H/H37S/V38D/T39Y/V41R/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K;

F30Y/R35K/R36H/H37E/R37aK/V38E/T39F/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bG/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36Q/H37E/V38A/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/K61D/I65V/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

F30Y/R35H/V38D/Y40H/V41R/T56A/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

R35N/H37T/R37aY/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R37aH/V38E/T39Y/V41R/T56A/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158A;

F30H/R35Q/H37T/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K;

F30H/R36L/V38E/V41R/K82R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K;

V38D/V41R/H99Q/C122S/Y151L/R217V;

R35Q/H37G/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35Q/R36H/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aE/Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35Q/H37Y/R37aD/V38E/T39L/V41R/D60aE/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35L/R36H/H37E/V38E/T39N/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

T39W/V41R/L97bG/H99Q/C122S;

F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35W/R36H/H37Q/V38E/T39H/Y40H/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K;

F30Y/R35Q/R36H/H37Y/R37aD/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bV/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/Y151L/M157K;

F30H/R35H/H37I/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149W/Y151L/M157K/R217S;

V38D/T39Y/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S;

R35F/H37D/R37aN/V38E/T39Y/V41R/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

T39Y/V41R/Y60bQ/L97bG/H99Q/C122S;

T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S;

V38D/V41R/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217E;

R36S/V38D/T39L/Y40L/V41R/L97bI/H99E/C122S/R217T;

F30Y/V38E/Y40H/V41R/T56A/L97bA/H99Q/C122S/M157K/K243M;

F30Y/R36H/R37aH/V38E/Y40H/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

F30H/R35Q/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K;

V38D/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R;

H37G/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R;

T39Y/V41R/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35H/R36H/H37D/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A;

V38E/T39W/V41R/D60aP/Y60bD/L97bA/H99L/C122S;

F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/I65T/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

V38D/V41R/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217V;

R35Q/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R36S/V38E/Y40Q/V41R/L97bG/H99L/C122S/Y151P/R217E;

H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E;

H37G/R37aD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R2

17E;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/K187S/K223S/K224Y;

F30H/R35H/V38D/V41R/K61E/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K/R206H;

F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30H/R35Q/H37W/V38D/V41R/D60aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/Y151L/M157K/R217D;

F30Y/R35F/R36H/H37G/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bS/T97aD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

T39Y/V41R/L97bG/H99Q/C122S;

F30Y/R35I/R36H/H37E/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bS/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K;

R35W/H37D/V38D/T39Y/V41R/Y60bS/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

V38D/T39F/Y40L/V41R/T97aW/L97bA/H99Q/C122S;

V38D/T39Y/Y40L/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39F/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

V38D/T39L/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S;

V38D/T39Y/Y40L/V41R/T97aW/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R36H/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99L/C122S/F141L/M157K/T158A;

F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aA/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

T39Y/V41R/Y60bP/L97bG/H99Q/C122S;

F30H/R36H/V38D/V41R/T56A/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K;

F30Y/R35E/R36H/H37D/R37aN/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

F30H/R35Q/H37W/V38D/V41R/D60aE/Y60bS/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/Y151L/M157K;

R35Q/H37G/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/

Y151P/M157K/Q192H;

F30Y/R35M/R36H/H37D/R37aD/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bT/T97aD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

V38D/T39L/Y40L/V41R/T97aV/L97bA/H99Q/C122S;

V38D/V41R/Y60bS/T97aI/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192F/R217E/K224R;

T39Y/V41R/Y60bP/L97bA/H99Q/C122S;

R36H/V38D/Y40F/V41R/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L/Q192E/R217D;

R35M/H37G/R37aD/V38E/T39W/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/V38D/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K/Q192H;

F30H/V38D/Y40F/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157F;

H37M/R37aD/V38E/T39A/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/Y151L/M157K;

T22I/F30Y/R35S/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/I138V/M157K;

R35L/H37D/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35L/V38D/Y40H/V41R/N76S/L97bA/H99Q/C122S/M157K/K187E;

F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157S;

R35W/H37D/V38D/T39Y/V41R/Y60bH/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R36H/H37G/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149Q/M157K;

R35Q/H37G/R37aE/V38W/T39Y/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R;

H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R;

V38D/T39Y/Y40M/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S;

R35Q/H37N/V38D/T39Y/V41R/Y60bP/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

R35Q/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

V38E/T39L/V41R/D60aN/Y60bP/L97bG/H99Q/C122S;

F30Y/R36H/H37A/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37E/R37aP/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149Q/M157K;

H37T/R37aL/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192R;

H37G/R37aD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R;

F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/Y40H/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

V38D/T39W/Y40L/V41R/T97aL/L97bA/H99Q/C122S;

H37G/R37aD/G37bD/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R;

T39Y/V41R/L97bA/H99Q/C122S;

V38D/T39L/Y40L/V41R/T97aW/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149N/L150V/M157K;

R35S/V38D/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157Y;

R37aS/V38D/T39Y/Y40F/V41R/H99L/C122S/R217T; y

cualquiera de estos polipéptidos en los que C122S no está modificado y es C122C, por numeración de quimotripsina

6. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 4 o reivindicación 5, en donde el ED_{50} del polipéptido u-PA es determinado por incubación de proteína de complemento de sustrato C3 humana con diferentes concentraciones del polipéptido u-PA durante 1 hora a 37°C.

7. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que escinde C3 con una ED_{50} de 50 nM o menos.

8. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 1, en donde las modificaciones en el polipéptido u-PA modificado consisten en modificaciones de aminoácidos corresponden a Y40Q/V41R/L97bA/C122S o Y40Q/V41R/L97bA.

9. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende las modificaciones de aminoácidos que corresponden a R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; o

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aT/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; o R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R; o R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aT/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R.

10. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 9, en donde el polipéptido no modificado consiste en el polipéptido de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5, el dominio de proteasa.

11. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 9, en donde el polipéptido no modificado consiste en el u-PA maduro de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 6.

12. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 9, en donde el polipéptido no modificado consiste en el pro-péptido de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4.

13. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 1, en donde las modificaciones de aminoácidos son seleccionadas de entre:
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; o R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L; o R35Q/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; o R35Q/H37Y/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; o R35Q/H37Y/R37aE/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; o R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; o R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; o R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; o R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/C122S/Y149R; o R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S; o R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aA/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; o R35L/H37D/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; o R35M/H37G/R37aD/V38E/T39W/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; o R35Q/H37G/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; o R35A/H37G/R37aE/V38E/T39F/V41R/D60aE/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; o

R35Q/H37S/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; o
R35Q/H37G/R37aE/V38E/T39H/V41R/D60aP/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; o
R35W/H37D/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aE/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; o R35Q/H37G/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; o R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/D97T/T97aE/L97bG/A98S/H99L/C122S; o
R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41K/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192A; o
R35Y/H37V/R37aW/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192T; o
R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L; o R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41K/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192T; o cada una de las anteriores en donde C122S es C122C, por numeración de quimotripsina.

14. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 que comprende las modificaciones de aminoácidos que corresponden a R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R o R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R, en donde el polipéptido de u-PA no modificado comprende el dominio proteasa expuesto en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5, o comprende el polipéptido de u-PA no modificado maduro establecido en la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 6.

15. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el polipéptido de u-PA modificado comprende la secuencia de residuos de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 8-15, 18-25, 28-30, 32-40, 42-44, 171, 176, 183, 184, 198, 199, 208, 211, 216-219, 221-228, 230-233, 240, 242, 243, 249, 260-265, 267, 268, 270-273, 275- 292, 299, 300, 307, 309, 311-315, 324-326, 329, 330, 335, 337-341, 346-351, 356-360, 363-365, 368-374, 376, 377, 381, 382, 387, 389, 390, 397, 398-404, 417, 436, 445-448, 466, 469, 475, 481, 484-487, 494-496, 498, 500, 503-511, 513-520, 523, 534, 535, 538, 540-547, 550-553, 555, 557, 561, 562, 564, 565, 568, 576, 584-587, 591, 592, 594, 595, 597, 598, 600, 601, 603-608, 611-625, 627-629, 633, 645, 647-651, 653, 655-658, 661, 663-722, 724-729, 731-754, 792-802, 807, 818, 820-824, 826, 827, 829-836, 839, 841, 842, 849, 850, 855, 868-879, 881-884, 886, 891, 893,

900-904, 921, 924-926, 932, 934-940, 942-944, 946-961, 963, 967, 972, 973, 975 y 977-986, o las mismas secuencias, excepto que el residuo en la posición C122 es C (Cys).

16. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde el polipéptido de u-PA modificado comprende la secuencia de residuos de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21 o 987.

17. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde el polipéptido de u-PA modificado comprende la secuencia de residuos de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 18.

18. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde el polipéptido de u-PA no modificado consiste de la secuencia de residuos de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5.

19. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 14, en donde el polipéptido de u-PA no modificado consiste de la secuencia residuos de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5.

20. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 15, en donde el polipéptido de u-PA no modificado consiste de la secuencia de residuos de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5.

21. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-20 que se escinde dentro de los residuos QHARASHLG (residuos 737-745) de C3 humana (SEQ ID NO: 47).

22. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 21, en donde el polipéptido u-PA modificado escinde los residuos QHARASHLG entre R y A.

23. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-22 que tiene estabilidad de más de 50% después de la incubación en PBS, o un fluido corporal durante 7 días.

24. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-23 que tiene estabilidad de más de 80% después de la incubación en PBS, o un fluido corporal durante 7 días.

25. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 23 o reivindicación 24, en donde la incubación se efectúa en un fluido corporal.

26. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 25, en donde el fluido corporal es humor acuoso.

27. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-26, en donde el polipéptido de u-PA modificado, cuando está en forma activa, tiene actividad disminuida al menos 100 veces en plasmina en comparación con una correspondiente forma de polipéptido de u-PA no modificado.

28. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-27 que se conjuga con otra porción o polímero, ya sea directamente o mediante un ligador.

29. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 28 que es una proteína de fusión.

30. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 28 o reivindicación 29 que está PEGilado.

31. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-30 que comprende un polímero que incrementa la semivida en suero y/o para reducir la inmunogenicidad o ambas.

32. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 31, en donde el polímero comprende un polipéptido.

33. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 28-32 que se enlaza directa o indirectamente a albúmina de suero.

34. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 33, en donde la albúmina de suero es una albúmina de suero humano (HSA).

35. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 33 o reivindicación 34, en donde la HSA que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 991, o una forma

que tiene al menos 90% o al menos 95% de identidad de secuencia a la misma.

36. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 28, en donde la porción es un dominio de multimerización que es un dominio Fc.

37. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 36, en donde el dominio Fc comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 50 o SEQ ID NO: 992 o una forma que tiene al menos 90% o al menos 95% de identidad de secuencia a la misma.

38. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 28-37, en donde el polímero se enlaza directamente al polipéptido de u-PA modificado.

39. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 28-38, en donde el polipéptido o el polímero se enlaza mediante un ligador peptídico al polipéptido de u-PA modificado.

40. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 39, en donde el ligador comprende Gly y/o Ser.

41. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 39 o la reivindicación40, en donde el ligador contiene hasta 20, 30, 40 o 50 residuos de aminoácidos.

42. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 39o la reivindicación 41, en donde el ligador comprende (GS)n o (G)n(S)n o (GGS)n o (SGG)n o (GGSSGG)n o (AGS)n, en donde n es 1 a 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 o un ligador que contiene hasta 25 residuos que contienen una o más de S, G, E y K.

43. El polipéptido u-PA modificado de la reivindicación 42, que comprende la secuencia de residuos de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1001-1003, y 1024-1029 y multímeros de las mismas y secuencias que tienen al menos 99% de identidad de secuencia a las mismas.

44. Una proteína de fusión, que comprende un polipéptido de u-PA modificadode cualquiera de las reivindicaciones 1-43 que se fusiona a un polipéptido de

no proteasa o una porción del mismo.

45. La proteína de fusión de la reivindicación 44, en donde el polipéptido de no proteasa es un dominio de multimerización o un dominio de transducción de proteína (PTD).

46. La proteína de fusión de la reivindicación 44, en donde el polipéptido no de proteasa es un dominio de multimerización que es un dominio Fc.

47. La proteína de fusión de la reivindicación 44, que comprende una secuencia de activación de furina.

48. La proteína de fusión de la reivindicación 47, en donde el sitio de activación de furina comprende QSGQKTLRRRKR (SEQ ID NO: 996) o QCGQKTLRRRKR (SEQ ID NO: 995) o QSGQKTLRRKR (SEQ ID NO: 1044).

49. Una proteína de fusión, que comprende un polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-43, en donde la proteína de fusión comprende una secuencia de señal y el polipéptido de u-PA modificado.

50. La proteína de fusión de la reivindicación 49, en donde la secuencia de señal es de Il-2, u-PA o IgGκ.

51. Una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 44-50, que comprende un compañero de fusión.

52. La proteína de fusión de la reivindicación 51, en donde el compañero de fusión es un dominio de multimerización.

53. La proteína de fusión de la reivindicación 51, en donde el compañero de fusión es albúmina, o un dominio Fc, o un anticuerpo de cadena individual u otro fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, o un dominio de unión a ácido hialurónico (HABD).

54. La proteína de fusión de la reivindicación 53, en donde el compañero de fusión es un HABD que es gen 6 estimulado por factor de necrosis tumoral (TSG-6).

55. La proteína de fusión de la reivindicación 53, en donde el compañero de

fusión es HSA.

56. La proteína de fusión de la reivindicación 53, en donde el compañero de fusión es Fc de IgG.

57. La proteína de fusión de la reivindicación 53, en donde el compañero de fusión es un fragmento scFv de anticuerpo de colágeno anti-tipo II o un anticuerpo anti-VEGFR o fragmento del mismo.

58. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 44-57, que comprende una secuencia de activación.

59. La proteína de fusión de la reivindicación 58, en donde la secuencia de activación comprende una cisteína, y el polipéptido de u-PA modificado comprende una cisteína libre, por lo que, en la activación, el polipéptido activado resultante comprende dos cadenas.

60 La proteína de fusión de la reivindicación 58, en donde la secuencia de activación es una secuencia de activación de u-PA o una secuencia de activación de furina.

61. La proteína de fusión de la reivindicación 60, en donde la secuencia de activación tiene la secuencia expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 995-998, 1041 y 1044.

62. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 44-61, que comprende una secuencia de activación, un polipéptido de u-PA modificado y HSA.

63. Una proteína de fusión de la reivindicación 44, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1006, 1007, 1009 y 1010.

64. Una proteína de fusión de la reivindicación 44, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1004-1019 y 1034-1040.

65. La proteína de fusión de la reivindicación 44, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1015 o 1019.

66. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 44-65 que no

tiene una secuencia de señal o de la cual se ha removido la secuencia de señal después de la expresión de la proteína de fusión.

67. Una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 44-66 que es una forma activada de dos cadenas que contiene una cadena A y una cadena B.

68. La proteína de fusión de la reivindicación 67, en donde la cadena B comienza en los residuos IIGG del polipéptido de u-PA modificado y termina en el extremo C-terminal de la proteína de fusión.

69. Una proteína de fusión de la reivindicación 67, que comprende un polipéptido de u-PA modificado y HSA.

70. La proteína de fusión de la reivindicación 67 o reivindicación 68, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NOs: 1005, 1011, 1014, 1015, 1016, 1019 y 1036, pero que carece de la secuencia de señal.

71. La proteína de fusión de la reivindicación 70, que comprende una cadena A de residuos 21-178 y una cadena B de residuos 179- al extremo C-terminal de la proteína con un enlace de disulfuro entre los residuos 168-299.

72. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 44-71 que es una proteína de fusión activada de dos cadenas, que comprende una cadena A y una cadena B, en donde la cadena A consiste de residuos 21-178 de SEQ ID NO: 1015 y la cadena B consiste de residuos 179-1022; y las cadenas A y B se enlazan mediante un puente de disulfuro entre C168 y C299 de SEQ ID NO: 1015.

73. La proteína de fusión de la reivindicación 52, que es un dímero mediante interacción de dominios de multimerización complementarios.

74. La proteína de fusión de la reivindicación 73, en donde el dominio de multimerización es un dominio Fc.

75. Una molécula de ácido nucleico, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de u-PA modificado o proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-74.

76. Un vector, que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 75.

77. El vector de la reivindicación 76 que es un vector procariota.

78. El vector de la reivindicación 76 que es un vector eucariótico.

79. El vector de la reivindicación 76 que es un vector viral.

80. El vector de la reivindicación 76 que es un vector de levadura.

81. El vector de cualquiera de las reivindicaciones 76-80 que es un vector de virus de herpes simple, o un vector de virus de vaccinia, o un vector adenoviral, o un vector viral adenoasociado, o un vector retroviral, o un vector de insecto.

82. El vector de cualquiera de las reivindicaciones 76-81 que es un vector de expresión.

83. El vector de cualquiera de las reivindicaciones 76-81 que es un vector de terapia génica.

84. Una célula recombinante aislada o un cultivo celular, que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 75 o el vector de cualquiera de las reivindicaciones 76-83.

85. Una línea de células no humanas, que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 75 o el vector de cualquiera de las reivindicaciones 76-83.

86. Una célula recombinante aislada, que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 75 o el vector de cualquiera de las reivindicaciones 76-83, en donde la célula aislada no es un cigoto humano.

87. Una combinación, que comprende:

(a) un polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-43 o una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 44-74; y

(b) un segundo agente o agentes para inhibir o reducir la activación del complemento.

88. La combinación de la reivindicación 87, en donde el segundo agente o agentes son uno o más agentes antiinflamatorios o anticoagulantes.

89. La combinación de la reivindicación 87 o reivindicación 88, en donde el segundo agente es uno o más agentes antiinflamatorios seleccionados de entre uno o más de un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID), antimetabolito, corticosteroide, analgésico, agente citotóxico, inhibidor de citocina proinflamatoria, citocina antiinflamatoria, agente de direccionamiento a células B, antígenos T de direccionamiento a compuestos, bloqueador de moléculas de adhesión, antagonista de receptor de quimiocina, inhibidor de cinasa, ligando PPAR-γ (gamma), inhibidor de complemento, heparina, warfarina, acenocumarol, fenindiona, EDTA, citrato, oxalato, argatroban, lepirudina, bivalirudina y ximelagatrán.

90. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 87-89, en donde el polipéptido de u-PA modificado comprende la modificación V41R o V41L.

91. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 87-90, en donde el polipéptido de u-PA modificado comprende la modificación V41R.

91. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 87-91, en donde el polipéptido de u-PA modificado comprende las modificaciones V38E/V41R.

93. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 87-91, en donde el polipéptido de u-PA modificado comprende las modificaciones Y40Q/V41R/L97bA o Y40Q/V41L/L97bA o R37aS/V41R/L97bG/H99Q.

94. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 87-91, en donde el polipéptido de u-PA modificado comprende las modificaciones:

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R

.

95. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 87-94, en donde el polipéptido de u-PA no modificado comprende la secuencia de residuos de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5.

96. Un método para elaborar un polipéptido de u-PA modificado, que comprende:

introducir un ácido nucleico o vector que codifica para un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-43 o una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 44-74 en una célula;

cultivar la célula bajo condiciones por lo cual se expresa el polipéptido; y

opcionalmente, aislar el polipéptido expresado.

97. El método de la reivindicación 96, en donde la célula es una célula eucariota.

98. El método de la reivindicación 97, en donde la célula es una célula de mamífero o una célula de levadura.

99. Una composición farmacéutica, que comprende un polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-43 o una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 44-74 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

100. La composición farmacéutica de la reivindicación 99, en donde el polipéptido de u-PA modificado o proteína de fusión está en una forma activada de dos cadenas.

101. La composición farmacéutica de la reivindicación 99 o reivindicación 100, en donde el polipéptido de u-PA modificado o proteína de fusión comprende un dominio de proteasa de SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 987.

102. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 99-101, en donde el polipéptido de u-PA modificado o proteína de fusión tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1015 o 1019.

POLIPÉPTIDOS DE ACTIVADOR DE PLASMINÓGENO, TIPO UROQUINASA, MODIFICADOS Y MÉTODOS DE USO

SOLICITUDES RELACIONADAS

Se reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos No. 62/786,302, titulada “POLIPÉPTIDOS DE ACTIVADOR DE PLASMINÓGENO, TIPO UROQUINASA, MODIFICADOS Y MÉTODOS DE USO", presentada el 28 de diciembre de 2018, de los inventores Edwin L. Madison, Christopher Thanos, Mikhail Popkov, Vanessa Soros y Kimberly Tipton, y al solicitante Catalyst Biosciences, Inc. Cuando se permita, la materia de esta solicitud se incorpora por referencia en su totalidad.

INCORPORACIÓN POR REFERENCIA DEL LISTADO DE SECUENCIAS PROPORCIONADO ELECTRÓNICAMENTE

Se presenta una versión electrónica del Listado de Secuencias, los contenidos del cual se incorporan en la presente por referencia en su totalidad. El archivo electrónico fue creado el 26 de diciembre de 2019, tiene un tamaño de 2294 kilobytes y se titula 4940seqPC1.txt.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Se proporcionan polipéptidos de u-PA modificados que escinden una proteína de complemento, inhibiendo de esta manera la activación del complemento. En virtud de esta inhibición, los polipéptidos de u-PA modificados se pueden usar para el tratamiento de enfermedades y condiciones mediadas por el complemento o en las cuales la activación del complemento juega un papel. Estas enfermedades y condiciones incluyen, pero no se limitan a, indicaciones oftálmicas, incluidas la degeneración macular, tal como degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y enfermedad de Stargardt, función retardada de injerto renal (DGF), trastornos isquémicos y de reperfusión, incluidos el infarto al miocardio y accidente cerebrovascular, sepsis, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias y enfermedades con un componente inflamatorio, incluida la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos neurodegenerativos.

ANTECEDENTES

El sistema de complemento (C) es parte del sistema inmunitario y desempeña un papel en la eliminación de patógenos invasores y en el inicio de la respuesta inflamatoria. El sistema de complemento de humanos y otros mamíferos comprende más de 30 proteínas solubles y unidas a membrana que participan en una secuencia ordenada de reacciones que dan como resultado la activación del complemento. El sistema de complemento sanguíneo tiene una amplia variedad de funciones asociadas con un amplio espectro de mecanismos de

defensa del hospedador incluidas acciones antimicrobianas y antivirales. Los productos derivados de la activación de componentes C incluyen las moléculas de no autoreconocimiento C3b, C4b y C5b, así como las anafilatoxinas C3a, C4a y C5a que tienen influencia en una variedad de respuestas inmunitarias celulares. Estas anafilatoxinas también actúan como agentes proinflamatorios.

El sistema de complemento está compuesto por un arreglo de enzimas y proteínas y receptores no enzimáticos. La activación del complemento se presenta por uno de los tres modos primarios conocidos como la vía "clásica", la vía "alternativa" y la vía de “lectina” (ver Figura 1). Habitualmente, el complemento se activa o desencadena por 1 de estas 3 vías, que, como se muestra en la Figura 1, convergen en la activación de C3. En un cuarto mecanismo de activación del complemento, referido la vía intrínseca, las serina-proteasas asociadas con la cascada fibrinolítica/coagulación activan el sistema de complemento directamente a través de la escisión de C3 o C5, independientemente de las vías clásica, alternativa y de lectina.

Estas vías se pueden distinguir por el proceso que inicia la activación del complemento. La vía clásica se inicia mediante complejos anticuerpo-antígeno o formas agregadas de inmunoglobulinas; la vía alternativa se inicia mediante el reconocimiento de estructuras en superficies microbianas y celulares; y la vía de lectina, que es una vía independiente de anticuerpos, se inicia mediante la unión de lectina de unión a manano (MBL, también designada proteína de unión a manosa) a carbohidratos, tal como aquellos que se despliegan en la superficie de bacterias o virus. La activación de las cascadas da como resultado la producción de complejos involucrados en proteólisis o lisis celular y péptidos involucrados en opsonización, anafilaxia y quimiotaxis.

La cascada de complemento, que es un componente central de la respuesta inmunitaria de un animal, es una cascada irreversible. Numerosos cofactores de proteínas regulan el proceso. La regulación inapropiada, habitualmente activación inapropiada, del proceso puede ser una faceta de, o puede presentarse en una variedad de trastornos que implican respuestas inflamatorias e inmunitarias inapropiadas, tal como aquellas observadas en enfermedades inflamatorias agudas y crónicas y otras condiciones que implican una respuesta inmunitaria inapropiada. Estas enfermedades y trastornos incluyen enfermedades autoinmunitarias, tal como artritis reumatoide y lupus, trastornos cardíacos y otras enfermedades inflamatorias, tal como sepsis y lesión por isquemia-reperfusión.

Debido a la implicación de las vías del complemento en una variedad de enfermedades y condiciones, los componentes de las vías del complemento son dianas para la intervención terapéutica, particularmente para la inhibición de la vía. Los ejemplos de estos

agentes terapéuticos incluyen agentes terapéuticos de moléculas pequeñas sintéticas y naturales, inhibidores de anticuerpos y formas solubles recombinantes de reguladores de complemento de membrana. Hay limitaciones a las estrategias para preparar estos productos terapéuticos. Las moléculas pequeñas tienen semividas cortas *in vivo* y se deben infundir continuamente para mantener la inhibición del complemento, limitando de esta manera su papel, especialmente en enfermedades crónicas. Los anticuerpos terapéuticos pueden dar como resultado una respuesta inmunitaria en un sujeto y, por lo tanto, pueden conducir a complicaciones en el tratamiento, particularmente en tratamientos diseñados para modular respuestas inmunitarias. Por lo tanto, existe la necesidad de productos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades mediadas por complemento y enfermedades en las que desempeña un papel la activación del complemento. Estas incluyen enfermedades inflamatorias agudas y crónicas**.** Por consiguiente, entre los objetivos de la presente, es un objetivo proporcionar estos productos terapéuticos para dirigirse o centrarse en la activación de la cascada del complemento y proporcionar productos terapéuticos y métodos de tratamiento de enfermedades.

BREVE DESCRIPCIÓN

Se proporcionan polipéptidos de activador de plasminógeno, tipo uroquinasa, modificados (u-PA) que incluyen inserciones, deleciones y/o reemplazos de aminoácidos en el dominio de proteasa que dan como resultado una mayor actividad de escisión en la proteína C3 de complemento en comparación con el dominio de proteasa de u-PA tipo silvestre (donde el dominio de proteasa puede incluir el reemplazo de la Cys libre con Ser para reducir/eliminar la agregación).

Los polipéptidos de u-PA modificados son cualquiera que comprende el dominio de proteasa, tal como proteasa activada de longitud completa, formas zimógenas de la misma y proteínas de fusión que contienen un polipéptido de u-PA modificado y un compañero de fusión que confiere propiedad o actividad farmacológica. Los polipéptidos de u-PA modificados y las proteínas de fusión que contienen los polipéptidos de u-PA modificados, cuando están en forma activa, inhiben la activación del complemento. En particular, estos polipéptidos y proteínas de fusión escinden C3 mediante lo cual se inhibe o elimina la actividad de C3.

Las modificaciones, incluidas deleciones, reemplazos e inserciones de aminoácidos, proporcionadas en la presente se encuentran en el dominio de proteasa. Los polipéptidos de u-PA modificados incluyen o son los dominios de proteasa. Los polipéptidos de u-PA modificados pueden incluir adicionalmente modificaciones postraduccionales y otras modificaciones diferentes a una secuencia de aminoácidos primaria, tal como conjugación o

unión a otros polipéptidos y porciones que alteran propiedades, tal como semivida en suero, y resistencia a proteasa endógena. Estas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, enlace a albúmina, enlace al o a los dominios de multimerización y PEGilación. De esta manera, los polipéptidos de u-PA modificados se pueden modificar por PEGilación, albuminación, farnisilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación y otras modificaciones de polipéptido, conocidas en la técnica. Entre las modificaciones está el reemplazo de una cisteína libre, en el zimógeno, tal como C122, por numeración de quimotripsina, con serina o alanina, para reducir la agregación, particularmente tras la expresión *in vitro*. Este reemplazo es opcional y no necesariamente se incluye en polipéptidos que se pegilarán o se expresarán *in vivo*.

Los polipéptidos de u-PA modificados inactivan la proteína C3 de complemento por escisión. Los polipéptidos de u-PA modificados escinden C3 para inhibir de esta manera la activación del complemento, escinden C3 en un sitio, tal como en el sitio activo, que inactiva o inhibe la actividad de C3 para inhibir así la activación del complemento. Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente se seleccionaron y diseñaron para escindirse dentro de QHARASHLG, y en particular donde P1-P1' es RA (QHAR↓ASHL; ver SEQ ID NO:47 residuos 737-744, donde la escisión se encuentra entre los residuos 740 y 741). Como resultado, estos polipéptidos de u-PA modificados se pueden utilizar como productos terapéuticos para tratar trastornos, enfermedades y/o condiciones en las que la activación del complemento juega un papel tal que la inhibición de los mismos puede tratar los trastornos, enfermedades y/o condiciones. Los polipéptidos de u-PA modificados también pueden tener actividad reducida para un sustrato natural, tal como plasminógeno, en comparación con un u-PA tipo silvestre o en comparación con uno que solo tiene el reemplazo correspondiente a C122S, por numeración de quimotripsina.

Entre las enfermedades y condiciones para las cuales los polipéptidos de u-PA modificados son cualquier enfermedad y condición mediada por C3 o mediada por complemento o involucrada. Estos incluyen trastornos oftálmicos, tal como degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y retinopatías diabéticas, y rechazo de órganos, tal como función retardada de injerto renal (DGF), así como otras enfermedades, trastornos y condiciones que se pueden tratar mediante la inhibición de la activación del complemento. La AMD se trata mediante administración al humor vítreo, tal como mediante inyección intravítrea o inyección intrarretiniana o subretiniana, y la DGF se trata mediante administración intravenosa u otra administración sistémica. Los polipéptidos de u-PA modificados y proteínas de fusión se pueden modificar adicionalmente, tal como mediante PEGilación, para intensificar o mejorar o impartir propiedades farmacológicas deseables, incluidas mayor semivida y/o inmunogenicidad disminuida. Otras enfermedades y condiciones incluyen, por ejemplo, artritis

reumatoide (RA), enfermedades oculares, glomerulonefritis membranoproliferativa (MPGN), esclerosis múltiple (MS), miastenia grave (MG), asma, enfermedad inflamatoria intestinal, lesión inflamatoria aguda mediada por complejo inmunitario (IC), enfermedad de Alzheimer (AD), lesión por isquemia-perfusión, síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS) y glomerulopatía de complemento 3 (C3G).

Los polipéptidos de u-PA no modificados incluyen formas precursoras, formas maduras, el dominio catalítico y formas catalíticamente activas del mismo, y también proteínas de fusión, tal como aquellas descritas en los Ejemplos 14-16. Los ejemplos de polipéptidos de u-PA no modificados son aquellos cuyas secuencias se exponen en SEQ ID NO.: 1-6. Entre los polipéptidos de u-PA no modificados se incluyen aquellos en los que la cisteína libre en el dominio catalítico (correspondiente a C122 por numeración de quimotripsina) se reemplaza por otro aminoácido, tal como S o A, particularmente S, que no altera la actividad catalítica, pero disminuye la agregación de los polipéptidos. Se entiende que todos los polipéptidos de u-PA modificados pueden incluir un reemplazo, en general S, en el residuo correspondiente a C122 por numeración de quimotripsina.

Entre los polipéptidos de activador de plasminógeno, tipo uroquinasa (u-PA), modificados proporcionados en la presente se encuentran aquellos que contienen una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas de entre reemplazos correspondientes a R35Q, H37Y, V41R, V41L, Y40Q, D60aP, L97bA, T97aI y H99Q, y modificaciones conservadoras de aminoácidos para estos, mediante las cuales el polipéptido de u-PA modificado tiene mayor actividad/especificidad para una proteína de complemento en comparación con la forma activa no modificada del polipéptido de u-PA, donde: las modificaciones de aminoácidos se seleccionan de entre reemplazos, inserciones y deleciones; los residuos correspondientes se pueden determinar mediante alineación con la forma madura de u-PA; el polipéptido de u-PA modificado escinde una proteína de complemento para inhibir o reducir así la activación del complemento en comparación con el polipéptido de u-PA no modificado que no contiene las modificaciones de aminoácidos; los residuos se numeran mediante numeración de quimotripsina; el polipéptido de u-PA no modificado comprende la secuencia expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-6 (u-PA humano de longitud completa tipo silvestre, u-PA de dominio de proteasa tipo silvestre (catalítico), u-PA maduro tipo silvestre, u-PA de longitud completa con el reemplazo correspondiente a C122S, u-PA de dominio de proteasa con el reemplazo correspondiente a C122S, y u-PA maduro con el reemplazo correspondiente a C122S) y fragmento catalíticamente activo del mismo que incluye el reemplazo o reemplazos de aminoácidos. Las modificaciones conservadoras se seleccionan de entre R35Y, W, F o N; H37 R, Q, E, W o F, V41K, D60aS, T97aD, L o V, L97bG o S y H99N, mediante numeración

de quimotripsina.

En particular, entre estos polipéptidos de activador de plasminógeno, tipo uroquinasa (uPA), modificados se encuentran aquellos que contienen una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas de entre reemplazos correspondientes a R35Q, H37Y, V41R, V41L, Y40Q, D60aP, L97bA, T97aI y H99Q.

Los polipéptidos de u-PA modificados tienen actividad y/o especificidad reducida para la escisión de una secuencia de sustrato en plasminógeno. La proteína de complemento para la cual los polipéptidos tienen mayor especificidad/actividad es C3; la escisión inactiva C3. El ejemplo de sitios de escisión está dentro del sitio activo de C3. Entre los polipéptidos de u-PA modificados están aquellos que tienen mayor actividad para la escisión de C3 que es al menos 3 veces mayor que el polipéptido de u-PA no modificado de SEQ ID NO: 5 (dominio de proteasa con el reemplazo C122S).

Los polipéptidos de u-PA modificados incluyen aquellos que contienen el reemplazo H37Y, tal como los reemplazos H37Y/V38E. Los polipéptidos de u-PA modificados incluyen aquellos que contienen los reemplazos R35Y/H37K o R35Q/H37K, tal como aquellos que comprenden los reemplazos R35Y/H37K/V38E o R35Q/H37K/V38E.

También se proporcionan los polipéptidos de u-PA modificados, incluidos los descritos anteriormente, que también contienen el reemplazo L97bA y/o R35Q, y/o H99Q, y/o D60aP, y/o T97aI.

El polipéptido de u-PA modificado puede incluir además el reemplazo de aminoácidos correspondiente a T39Y, T39W, T39F, tal como T39Y, o reemplazos conservadores seleccionados de T39M o T39L. Otros de los polipéptidos de u-PA modificados incluyen o incluyen además los reemplazos de aminoácidos R35Q/H37Y y/o V38E/V41R/Y149R.

Otros de los polipéptidos de u-PA modificados son aquellos que comprenden la modificación V41R, tal como polipéptidos de u-PA modificados que comprenden las modificacionesV38E/V41R, incluidos aquellos que comprenden además un reemplazo en una o más de las posiciones R35, H37 y V38. Estos incluyen polipéptido de u-PA modificado en el que el reemplazo en V38 es E, tal como, por ejemplo, polipéptidos de u-PA modificados que comprenden R35Y/H37S/V38E/V41R, H37Y/V38E y otras combinaciones de residuos que contribuyen a la escisión de C3 y/o estabilidad, tal como en un fluido corporal.

Entre los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente se encuentran los que tienen un a ED_{50} para la escisión por inactivación de C3 de menos de o 100 nM, o 50 nM o 30 nM o 25 nM en un ensayo *in vitro*. Los ejemplos de estos son aquellos expuestos en la Tabla 14, donde la ED_{50} es 100 nM o menos, o aquellos expuestos en la Tabla

14, donde la ED_{50} es menos de 50 nM, o aquellos expuestos en la Tabla 14, donde la ED_{50} es menos de 30 nM, o aquellos expuestos en la Tabla 14, donde la ED_{50} es menos de 25 nM. El ejemplo de un ensayo para evaluar ED_{50} es uno que comprende incubación de la proteína C3 humana de complemento de sustrato con varias concentraciones de cada proteasa modificada durante 1 hora a 37 ºC para determinar ED_{50}. En particular, los polipéptidos de u-PA modificados son cualquiera que escinda C3 con una ED_{50} de 50 nM o menos.

Los polipéptidos de u-PA no modificados pueden consistir de la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO:1-6 o pueden incluir modificaciones adicionales, incluyendo inserciones y deleciones adicionales. Cualquiera de los reemplazos, inserciones o deleciones en la presente se puede incluir en los polipéptidos de u-PA no modificados, tal como el dominio de proteasa, particularmente el dominio de proteasa de SEQ ID NO:5. El polipéptido de u-PA modificado puede tener al menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con los polipéptidos de cualquiera de SEQ ID NO.: 1-6 o una porción catalíticamente activa del mismo. Los polipéptidos de u-PA modificados pueden contener 1 o hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 reemplazos, inserciones o deleciones de aminoácidos, en comparación con el polipéptido de u-PA no modificado de cualquiera de las SEQ ID NO.: 1-6 o una porción catalíticamente activa del mismo.

Por lo tanto, se proporcionan polipéptidos de u-PA modificados que contienen la modificación V41R, o H37Y, o L97bA, o R35Q, o H99Q, o D60aP, o T97aI o combinaciones de los mismos. Cualquiera de los polipéptidos de u-PA modificados puede contener además el reemplazo de aminoácidos correspondiente a T39Y, T39W, T39F o reemplazos conservadores de los mismos seleccionados de T39M o T39L. En particular, los polipéptidos de u-PA modificados pueden contener adicionalmente el reemplazo de aminoácidos T39Y, tal como la combinación T39Y/V41R, y hasta 12 o 13 modificaciones adicionales, así como el C122S opcional. Cualquiera de los polipéptidos de u-PA modificados puede contener además el reemplazo de aminoácidos V38E, y puede contener además una o más de las modificaciones de aminoácidos R35Q, Y60bQ y/o Y149R. Cualquiera de los polipéptidos de u-PA modificados puede contener además la modificación de aminoácidos R37aE o R37aS. Por lo tanto, los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente pueden contener los reemplazos R35Q/H37Y/T39Y/V41R o R35Q/H37Y/T39Y/V41R/C122S. Cualquiera de los polipéptidos de u-PA modificados puede contener el reemplazo correspondiente a H99Q.

Entre los polipéptidos u-PA modificados proporcionados en la presente se encuentran aquellos que contienen las modificaciones de aminoácidos R35Q/H37Y/

T39Y/V41R/L97bA/H99Q/C122S o R35Q/H37Y/ T39Y/V41R/L97bA/H99Q, o T39Y/V41R/Y60bQ/L97bA/H99Q o T39Y/V41R/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S o T39Y/V41R/D60aP/L97bA/H99Q/C122S o T39Y/V41R/D60aP/L97bA/H99Q/C122S. También entre los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente se encuentran aquellos que contienen las modificaciones de aminoácidos correspondientes a Y40Q/V41L/L97bA/C122S o Y40Q/V41R/L97bA/C122S o Y40Q/V41L/L97bA o Y40Q/V41R/L97bA o

R37aS/V41R/L97bG/H99Q o R37aS/V41R/L97bG/H99Q/C122S o

T39Y/V41L/L97bA/H99Q/C122S o T39Y/V41R/L97bA/H99Q/C122S.

Entre los polipéptidos de u-PA modificados se incluyen aquellos que contienen las modificaciones:

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R o R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R.

Se proporcionan polipéptidos de u-PA modificados que contienen las modificaciones de aminoácidos, se incluyen polipéptidos con las modificaciones: H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; o R35Q/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; o R35Q/H37Y/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; o R35Q/H37Y/R37aE/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; o R35Q/H37Y/R37aE/V38E/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; o R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; o R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; o R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; o R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; o R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/H99Q/C122S/Y149R; o R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/C122S/Y149R; o R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S o R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aA/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R o R35L/H37D/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R o R35M/H37G/R37aD/V38E/T39W/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R o R35Q/H37G/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R o

R35A/H37G/R37aE/V38E/T39F/V41R/D60aE/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R o
R35Q/H37S/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R o
R35Q/H37T/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aE/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R o
R35Q/H37G/R37aE/V38E/T39H/V41R/D60aP/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R o
R35W/H37D/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aE/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R o
R35Q/H37G/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R o
R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/D97T/T97aE/L97bG/A98S/H99L/C122S o
R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41K/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192A o
R35Y/H37V/R37aW/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192T o
R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41K/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192T o

cada uno sin reemplazo en C122. Los ejemplos de estos polipéptidos deu-PA modificados son aquellos que contienen las modificaciones R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R.

Los ejemplos de estos polipéptidos son aquellos cuyas secuencias se exponen en cualquiera de SEQ ID NO.: 8-44 y 987, tal como 21 y 39-44, así como polipéptidos de u-PA modificados de longitud completa y precursores que contienen los polipéptidos cuyas secuencias se exponen en SEQ ID NO.: 8-44 y porciones catalíticamente activas de los mismos. También se entiende que en cualquiera de los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente, la Cys en el residuo 122, mediante numeración de quimotripsina, se puede sustituir con Ser o puede permanecer Cys. La Cys se retiene para modalidades en las que el polipéptido, incluidas proteínas de fusión, que contiene el dominio de proteasa de u-PA modificado está destinado a usarse como una forma de dos cadenas en la que el C122 libre forma un enlace de disulfuro con otra Cys libre en el polipéptido, o la Cys se modifica, tal como mediante PEGilación. En todas las modalidades descritas en la presente, la posición 122 puede ser Cys o Ser. El experto en la técnica puede seleccionar el residuo adecuado dependiendo del uso propuesto.

El polipéptido de u-PA no modificado comprende el dominio de proteasa de

cualquiera de SEQ ID NO: 1-6, o una parte catalíticamente activa de la misma, que incluye o contiene solo el dominio de proteasa de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:5.

El polipéptido de u-PA modificado puede contener modificaciones adicionales, incluidas modificaciones postraduccionales, modificaciones que introducen o eliminan un sitio de glicosilación, modificación, tal como unión o conjugación a un polímero, tal como un PEG para aumentar la semivida en suero y/o reducir la inmunogenicidad o ambas. En particular, cualquiera y todos los polipéptidos de u-PA modificados descritos y proporcionados en la presente se pueden PEGilar. También se proporcionan proteínas de fusión que contienen los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente, tal como fusión con un dominio Fc, o un agente de especificidad a diana específico para una célula o antígeno buscado como diana.

Entre los polipéptidos de u-PA modificados y proteínas de fusión proporcionadas en la presente se encuentran aquellos que tienen estabilidad mayor que 50% u 80% después de la incubación en PBS o en un fluido corporal, tal como humor acuoso o suero durante 7 días. También entre los polipéptidos de u-PA modificados se encuentran aquellos que, cuando están en forma activa, tienen al menos 100 veces menor actividad sobre plasmina en comparación con una forma correspondiente de polipéptido de u-PA no modificado.

También entre los polipéptidos de u-PA modificados y las proteínas de fusión proporcionadas en la presente se encuentran aquellos que tienen una ED_{50} para la escisión por inactivación de C3 de menos de o 100 nM, o 50 nM o 30 nM o 25 nM o 15 nM o 10 nM en un ensayo in vitro, tal como cualquiera ejemplificado en los Ejemplos en la presente. Estos incluyen polipéptidos que contienen o son los dominios de proteasa expuestos en la Tabla 14, que lista numerosas cadenas de mutación y la ED_{50} para dominios de proteasa de polipéptidos de u-PA modificados que exhiben la ED_{50} valorada como se describe en el Ejemplo 2. Los polipéptidos de u-PA modificados y polipéptidos de fusión que tienen una ED_{50} de 100 nM o menos, menos de 50 nM, menos de 30 nM, menos de 25 nM, menos de 15 nM, menos de 10 nM, se encuentran entre aquellos que se pueden usar como dominios de proteasa, o en formas de u-PA más largas y/o en proteínas de fusión como se describe en la presente.

Se proporcionan proteínas conjugadas, incluidas proteínas de fusión que contienen un polipéptido de u-PA modificado o una porción catalíticamente activa de cualquiera de los polipéptidos de u-PA modificados fusionados a un polipéptido no proteico o una porción del mismo. Se proporcionan polipéptidos no de proteasas tal como aquellos que incluyen un dominio de multimerización, tal como un dominio Fc, un polipéptido, tal como albúmina, que aumenta la estabilidad en suero, o un dominio de transducción de proteínas (PTD).

Como se analiza anteriormente, todas las modificaciones pueden estar en los polipéptidos no modificados cuyas secuencias se exponen en cualquiera de SEQ ID NO.: 1-6 y porciones catalíticamente activas de los mismos. Entre los polipéptidos se incluyen aquellos en los que el polipéptido no modificado tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO:5 (el dominio de proteasa con el reemplazo C122S).

También se proporcionan proteínas de fusión que contienen los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente y polipéptidos adicionales, tal como albúmina sérica, dominios de multimerización, secuencias señal y otras secuencias y etiquetas de tráfico para facilitar la expresión y aislamiento. Las proteínas de fusión también pueden incluir secuencias de activación para activar las porciones de u-PA. Las formas activas de las proteínas de fusión se producen tras la expresión y eliminación de secuencias de señal, y cualquier otra señal de procesamiento y tráfico para dar como resultado proteínas de fusión activas que escinden C3. Las formas activas de las proteínas de fusión incluyen 2 formas activadas en cadena y también dímeros, tal como aquellos que resultan de la inclusión de un dominio de multimerización.

Entre las proteínas de fusión se encuentran aquellas que contienen un polipéptido de u-PA modificado o una porción catalíticamente activa de un polipéptido de u-PA modificado, tal como aquellas en la Tabla 14, que se fusiona a un polipéptido no proteico o una porción del mismo. Las proteínas de fusión también pueden incluir secuencias de activación y, antes del procesamiento, secuencias de señal y otras señales de tráfico. Los polipéptidos no de proteasa incluyen, pero no se limitan a, cualquiera conocido por los expertos en la técnica para conferir una actividad o propiedad farmacéutica deseable, un dominio de multimerización, tal como un F_c, un dominio de transducción de proteínas (PTD), un dominio de unión a ácido hialurónico (HABD), un anticuerpo para dirigirse a, o tomar como diana, un antígeno particular. Las proteínas de fusión también pueden incluir secuencias de activación, tal como una secuencia de activación de u-PA natural o una secuencia de activación de furina. Los ejemplos de secuencias de activación de furina son aquellas que son o comprenden QSGQKTLRRRKR (SEQ ID NO:996) o QCGQKTLRRRKR (SEQ ID NO:995) o QSGQKTLRRKR (SEQ ID NO: 1044) o un sitio de activación de furina que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con ésta.

Por ejemplo, las proteínas de fusión que comprenden cualquiera de los polipéptidos de u-PA modificados tal como se describen o proporcionan en la presente, y también incluyen, antes del procesamiento o activación, una secuencia de señal y el polipéptido de u-PA modificado o una porción catalíticamente activa del mismo. Las secuencias de señal para codificar para la secreción de las proteínas de fusión incluyen, por

ejemplo, una secuencia de señal de Il-2, u-PA o IgGκ.

Las proteínas de fusión pueden incluir un compañero de fusión, tal como un dominio de multimerización, o un polipéptido que aumenta la semivida en suero, o uno que confiere otra propiedad o actividad farmacológica deseable. Los ejemplos de las mismas son una albúmina, o un dominio Fc, o un anticuerpo de cadena individual u otro fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, o un dominio de unión a ácido hialurónico (HABD). Los compañeros de fusión de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, gen 6 estimulado por factor de necrosis tumoral (TSG-6); HSA, Fc de IgG, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como un fragmento scFv de anticuerpo anti-colágeno tipo II o un anticuerpo anti-VEGFR o fragmento del mismo.

Las proteínas de fusión también pueden incluir una secuencia de activación de modo que la proteína de fusión resultante que contiene u-PA se encuentre en una forma activa, tal como una forma de dos cadenas. Las secuencias de activación pueden contener o modificarse para contener una cisteína, que puede formar un enlace de disulfuro con una Cys libre, tal como C122, en el polipéptido de u-PA modificado, mediante el cual, tras la activación, el polipéptido activado resultante comprende dos cadenas. Las secuencias de activación de ejemplo son una secuencia de activación de u-PA y una secuencia de activación de furina, y formas modificadas de las mismas, esta secuencia de activación que tiene la secuencia expuesta en cualquiera de SEQ ID NO:995-998, 1041, y 1044 o una secuencia que tiene al menos 98% o 99% de identidad de secuencia con la misma.

Las proteínas de fusión de ejemplo son aquellas que contienen una secuencia de activación, un polipéptido de u-PA modificado y HSA, tal como cualquiera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1014, 1015, 1016, 1019 y 1040 o una forma modificada de la misma que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad de secuencia (y que contiene las modificaciones en la secuencia de la porción u-PA). Para su uso en métodos de tratamiento, las proteínas de fusión en general no contienen la secuencia de señal. Para su uso en métodos de terapia génica, el ácido nucleico puede codificar para la secuencia de señal.

Se proporcionan estas proteínas de fusión, tal como aquellas que contienen la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID Nos: 1004-1019 y 1034-1040 o cualquiera que tenga al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad de secuencia (y que contenga las modificaciones en la secuencia de la porción u-PA). Los ejemplos de proteínas de fusión son aquellas que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:1015 o 1019. En particular, la secuencia de señal se elimina antes del uso o tras la expresión *in vivo* o cuando se produce *in vitro*. Estas incluyen aquellas que están en forma activada de dos

cadenas que contienen una cadena A y una cadena B. Por ejemplo, proteínas de fusión, donde la cadena B comienza en los residuos IIGG del polipéptido de u-PA modificado y termina en el extremo C-terminal de la proteína de fusión, tal como aquellas que contienen un polipéptido de u-PA modificado y HSA, aquellas que contienen la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID Nos. 1005, 1011, 1014, 1015 y 1036, pero que carecen de la secuencia señal. Los ejemplos de proteínas de fusión en forma activada es una proteína de fusión que contiene una cadena A de residuos 21-178 y una cadena B de residuos 179- al extremo C-terminal de la proteína con un enlace de disulfuro entre los residuos 168-299. Se entiende que estos también incluyen proteínas de fusión que tienen al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad de secuencia (y que contienen las modificaciones en la secuencia de la porción u-PA). Por ejemplo, se proporciona una proteína de fusión que contiene una cadena A y una cadena B, donde la cadena A consiste de los residuos 21-178 de SEQ ID No. 1015, y la cadena B consiste de los residuos 179-1022; y las cadenas A y B están unidas a través de un puente de disulfuro entre C168 y C299 de SEQ ID NO:1015.

Otras proteínas de fusión proporcionadas en la presente contienen dominios de multimerización de modo que, tras el procesamiento, forman multímeros, tal como dímeros que se forman a través de la interacción de dominios de multimerización complementarios, tal como dominios Fc.

También se proporcionan combinaciones, que se pueden envasar como un kit, que contienen una primera composición que contiene un polipéptido de u-PA modificado, incluidas, como en todas las modalidades, proteínas de fusión, particularmente aquellas en forma activada, o una pluralidad de las mismas, y una segunda composición que contiene un segundo agente o agentes para tratar una enfermedad o trastorno mediado por complemento. El segundo agente o agentes, por ejemplo, pueden ser uno o más agentes antiinflamatorios o anticoagulantes. Los ejemplos de estos agentes son uno o más agentes antiinflamatorios seleccionados de entre uno o más de un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID), antimetabolito, corticosteroide, analgésico, agente citotóxico, inhibidor de citocinas proinflamatorias, citocinas antiinflamatorias, agentes dirigidos, o con especificidad, a linfocitos B, compuestos dirigidos a antígenos T, bloqueadores de moléculas de adhesión, antagonistas del receptor de quimiocina, inhibidores de cinasas, ligandos PPAR-γ (gama), inhibidores de complemento, heparina, warfarina, acenocumarol, fenindiona, EDTA, citrato, oxalato, argatrobán, lepirudina, bivalirudina y ximelagatrano.

Se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican para cualquiera de los polipéptidos de u-PA modificados y proteínas de fusión proporcionadas en la presente. También se proporcionan vectores que contienen estas moléculas de ácido nucleico y que

codifican para los polipéptidos de u-PA modificados. Los vectores incluyen vectores procarióticos y vectores eucarióticos, incluidos vectores de mamíferos e insectos, tal como un vector de baculovirus, vectores de levadura, tal como *Pichia* y *Saccharomyces*, y vectores virales, tal como un vector de virus de herpes simple, o un vector de virus de vaccinia, un vector de AAV, un vector adenoviral o un vector retroviral. Los vectores pueden ser vectores de expresión para la producción de los vectores y/o polipéptidos de u-PA modificados, tal como adenovirus y virus AAV, particularmente aquellos con tropismo para el tejido de interés, tal como hígado o el ojo, para terapia génica.

Se proporcionan métodos para producir los polipéptidos de u-PA modificados mediante el cultivo de una célula que contiene un vector o ácido nucleico que codifica para un polipéptido de u-PA modificado o proteína de fusión bajo condiciones en las que se expresa el vector y, opcionalmente, aislar o recuperar el polipéptido de u-PA modificado expresado.

También se proporcionan células aisladas y cultivos de células que contienen las moléculas de ácido nucleico o los vectores. Las células pueden ser células no humanas o cultivos de células humanas, pero no incluyen ningún cigoto o células que se desarrollen en un humano. Las células incluyen células de mamífero y células bacterianas, incluidas, pero no se limitadas a, células bacterianas, tal como *E. coli*, CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, NS0 de ratón, BHK, células insectiles, células de levadura y otras células utilizadas rutinariamente para la expresión recombinante de polipéptidos. Los métodos para producir el polipéptido de u-PA modificado incluyen cultivar las células bajo condiciones en las que se expresa el polipéptido de u-PA modificado codificado y opcionalmente aislar o purificar el polipéptido de u-PA modificado. En general, los polipéptidos de u-PA modificados y conjugados de los mismos, tal como proteínas de fusión, se producen en células que glicosilan las proteínas. Los polipéptidos de u-PA modificados aislados se pueden modificar adicionalmente, tal como mediante PEGilación.

También se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen los polipéptidos modificados y proteínas de fusión y/o los ácidos nucleicos y/o los vectores. Se proporcionan usos de las composiciones farmacéuticas, ácidos nucleicos o polipéptidos de u-PA modificados para inhibir la activación del complemento para tratar así una enfermedad o trastorno mediado por la activación del complemento o en el que la activación del complemento juega un papel en la etiología o etiología subyacente de la enfermedad o trastorno. En particular, se proporcionan usos de las moléculas de ácido nucleico y/o vectores para terapia génica para tratar estas enfermedades, trastornos y condiciones, mediados por o que implican la activación del complemento, donde la inhibición de la activación del complemento afecta el tratamiento o mejora de la enfermedad o condición. También se

proporcionan métodos para tratar una enfermedad o condición mediada por o que implica la activación del complemento mediante la administración de los vectores o la administración de las moléculas de ácido nucleico. En particular, las enfermedades, trastornos y condiciones son aquellas en las que la inactivación de C3 para inhibir o reducir de esta manera el tratamiento de efectos de activación del complemento.

Las enfermedades, trastornos o condiciones mediadas por el complemento o enfermedades, trastornos y condiciones en las que la activación del complemento juega un papel en la etiología o etiología subyacente, incluyen, pero no se limitan a, cualquier trastorno inflamatorio, sepsis, artritis reumatoide (RA), enfermedad ocular u oftálmica, trastornos cardiovasculares, glomerulonefritis membranoproliferativa (MPGN), esclerosis múltiple (MS), miastenia grave (MG), asma, enfermedad intestinal inflamatoria, lesión inflamatoria aguda mediada por complejo inmunitario (IC), enfermedad de Alzheimer (AD), lesión por isquemia-reperfusión, síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS), glomerulopatía de complemento 3 (C3G) y rechazo de trasplante de órganos, particularmente rechazo retrasado de trasplante de órganos. Las enfermedades y trastornos particulares incluyen trastornos oculares u oftálmicos, tal como una degeneración macular o una retinopatía diabética, o inflamación debida a un órgano trasplantado. Entre las enfermedades, trastornos y condiciones se incluyen la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y la función retardada de injerto renal (DGF).

Se proporcionan métodos para inhibir la activación del complemento. Los métodos se efectúan poniendo en contacto un polipéptido de u-PA modificado con la proteína C3 de complemento, por lo que la proteína C3 de complemento se escinde de modo que se reduce o inhibe la activación del complemento. La puesta en contacto se puede efectuar *in vitro*, pero en general es *in vivo*, mediante la administración del polipéptido de u-PA modificado a un sujeto en el que se desea la inactivación o reducción de complemento. La administración puede ser sistémica, tal como parenteral, incluso intravenosa o localmente, tal como al poner en contacto un tejido afectado, tal como el ojo. La administración al ojo incluye mediante gotas, mediante la unión del polipéptido de u-PA modificado a un dominio de transducción de proteínas, o mediante inyección intravítrea, inyección intrarretiniana o subretiniana u otro método de este tipo. Para enfermedades y condiciones, tal como DGF, la administración se puede efectuar mediante administración intravenosa. Otros métodos incluyen administración subcutánea y transdérmica.

Los métodos y usos incluyen el tratamiento de cualquier enfermedad, trastorno o condición donde la inhibición de la activación del complemento conduce a una reducción de los síntomas inflamatorios asociados con una enfermedad o trastorno mediado por

complemento seleccionado de entre un trastorno inflamatorio, un trastorno neurodegenerativo, un trastorno oftálmico y un trastorno cardiovascular. Estos incluyen, pero no se limitan a, enfermedades, condiciones y trastornos inflamatorios, sepsis, artritis reumatoide (RA), trastornos oculares, glomerulonefritis membranoproliferativa (MPGN), esclerosis múltiple (MS), miastenia gravis (MG), asma, enfermedad inflamatoria intestinal, lesión inflamatoria aguda mediada por complejo inmunitario (IC), síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS), glomerulopatía de complemento 3 (C3G), enfermedad de Alzheimer (AD), trastornos oftálmicos, tal como AMD y retinopatías diabéticas, y lesión por isquemia-reperfusión. La lesión por isquemia-reperfusión puede implicar o ser provocada por un evento o tratamiento seleccionado de entre infarto al miocardio (MI), accidente cerebrovascular, angioplastia, injerto de derivación de arteria coronaria, derivación cardiopulmonar (CPB) y hemodiálisis o un tratamiento de un sujeto. El tratamiento con el polipéptido de u-PA modificado se efectúa antes del tratamiento de un sujeto. Los tratamientos incluyen trasplante de órganos. La enfermedad, trastorno o condición incluye condiciones oftálmicas o es una enfermedad ocular o es rechazo o inflamación debido a un órgano trasplantado, tal como una retinopatía diabética o una degeneración macular. En particular, se proporcionan métodos de tratamiento de degeneración macular relacionada con la edad (AMD), así como métodos de tratamiento de función retardada de injerto renal (DGF). El tratamiento se puede efectuar por vía intravenosa o subcutánea o localmente, tal como mediante inyección en el ojo del polipéptido de u-PA modificado. Se incluye inyección o unión intravítrea o intrarretiniana, subretiniana del polipéptido de u-PA modificado a un dominio de transducción de proteína para facilitar la transducción en el humor vítreo. El polipéptido de u-PA modificado se puede unir o conjugar con porciones que efectúan el direccionamiento del polipéptido hacia un órgano o tejido particular, o que aumentan la semivida en suero o reducen la inmunogenicidad, tal como PEGilación y/o unión a un dominio Fc o a un anticuerpo o parte de unión al antígeno del mismo.

Por lo tanto, se proporcionan métodos para tratar un sujeto con un trastorno o condición mediada por complemento o uno en el que la activación del complemento juega un papel en ese trastorno o condición, mediante la administración de un polipéptido de u-PA modificado proporcionado en la presente. También se proporcionan estos usos de los polipéptidos de u-PA modificados y proteínas de fusión proporcionadas en la presente. Los polipéptidos de u-PA modificados y el tratamiento del efecto de proteína de fusión o se pueden usar para este tratamiento porque escinden la proteína C3 de complemento para inhibir o reducir de esta manera la activación del complemento. La inhibición de la activación del complemento conduce a una reducción de los síntomas inflamatorios asociados con un

trastorno, enfermedad o condición mediada por complemento que implica una respuesta inflamatoria, lo que conduce a una reducción de los síntomas inflamatorios asociados con una enfermedad, condición o trastorno mediada por complemento seleccionado de entre un trastorno inflamatorio, un trastorno neurodegenerativo y un trastorno cardiovascular. Estos incluyen condiciones oftálmicas, tal como retinopatía diabética y degeneración macular, y también rechazo retardado de órganos, tal como DGF.

En la presente se proporcionan la dosis para los usos y métodos y formulaciones de dosificación individual. El profesional médico experto puede determinar empíricamente una dosis individual e incluye, por ejemplo, dosis individuales que se encuentran en el intervalo de 0.1 mg a 1 mg para administración local y 0.1 mg a 10, 15, 20, 30 mg o más para administración sistémica, tal como administración intravenosa. La dosificación particular depende del trastorno o enfermedad o condición particular, el sujeto tratado, la etapa de la enfermedad, el trastorno o condición, la vía de administración, el régimen y otros parámetros similares. Las dosis se pueden repetir diariamente, cada dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete días, al menos dos veces por semana, al menos cada dos semanas, tres semanas, cuatro semanas o intervalos más prolongados. El régimen y dosis particulares dependen, por ejemplo, del trastorno tratado, el modo de administración y detalles, tal como peso, del sujeto. La determinación del mismo está dentro de la habilidad del profesional médico experto.

También se proporcionan los métodos, usos y combinaciones y polipéptidos de u-PA modificados y proteínas de fusión, donde el polipéptido de u-PA modificado comprende la modificación V41R o V41L, particularmente V41R, tal como V41I o R y V38E, y aquellos que contienen H37Y/V38E. Los ejemplos de este polipéptido de u-PA modificado son polipéptidos de u-PA modificados que contienen las modificaciones Y40Q/V41R/L97bA o Y40Q/V41L/L97BA o R37aS/V41R/L97bG/H99Q, o R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R. Las modificaciones se encuentran en cualquier polipéptido de u-PA no modificado, incluidos aquellos expuestos en cualquiera de SEQ ID NO.: 1-6, y partes catalíticamente activas de los mismos que incluyen el residuo correspondiente a V41. Los ejemplos de estos polipéptidos de u-PA modificados son los polipéptidos de u-PA modificados que comprenden la secuencia de residuos de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21 o 987 o en cualquiera de las SEQ ID Nos., 40-44 o 40-44 sin la modificación en C122, mediante numeración de quimotripsina, y partes catalíticamente activas de los mismos, y formas modificadas de los mismos, tal como formas PEGiladas, y proteínas de fusión y formas modificadas de los mismos.

También se proporcionan métodos para tratar trastornos, tal como DGF, mediante la administración intravenosa de un polipéptido de u-PA modificado o proteína de fusión (en

forma activada) como se describe y proporciona en la presente, incluidos los polipéptidos de u-PA modificados que comprenden la secuencia de residuos de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO:21 y 40-44, y formas modificadas de los mismos, tal como formas PEGiladas. El profesional médico experto puede determinar empíricamente una dosis individual e incluye dosis individuales que se encuentran en el intervalo de 0.1 mg a 1 mg. La dosis depende del sujeto, la gravedad o etapa de la enfermedad o trastorno, tal como DGF. El tratamiento puede repetirse múltiples veces, tal como dos, tres o cuatro veces al día, una vez al día, repetirse cada 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, semanal, bimensual o mensual. El polipéptido de u-PA modificado puede ser uno que comprende los reemplazos/inserciones, por numeración de quimotripsina, R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; y por numeración madura R20Q/H22Y/R23E/V27E/T28Y/V30R/D50P/Y51Q/T91I/L92A/H94Q/C121S/ Y148R. El ejemplo del mismo es el polipéptido de u-PA modificado que contiene el dominio de proteasa expuesto en SEQ ID NO:21 o una porción catalíticamente activa del mismo, o las formas de longitud completa o precursor que contienen el dominio de proteasa, y formas modificadas del mismo, tal como formas PEGiladas y proteínas de fusión. La administración se puede efectuar por cualquier método adecuado, incluidas las vías intravenosa, subcutánea, transdérmica, local, intramuscular, oral y otras vías de administración sistémica. En general, la forma administrada de los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente es una forma activada, que en general, dependiendo de los componentes de la proteína (ver, por ejemplo, Ejemplo 15), es una forma de dos cadenas.

Los métodos como se describen en la presente, como se describió anteriormente y más adelante, incluyen métodos para tratar un trastorno oftálmico o trastorno ocular mediante la administración de cualquiera de los polipéptidos de u-PA modificados y formas modificadas de los mismos, tal como formas PEGiladas y proteínas de fusión, tal como aquellas que contienen un dominio de transducción de proteínas, proporcionado en la presente, al ojo. Los trastornos, enfermedades o condiciones oftálmicas que implican la activación del complemento incluyen retinopatías diabéticas y degeneración macular, tal como AMD. La dosis es como se describió anteriormente e incluye dosis individuales de 0.1 mg a 1 mg. Los polipéptidos de u-PA modificados incluyen aquellos que contienen los reemplazos R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R o R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R, Y40Q/V41L/L97bA/C122S o Y40Q/V41R/L97bA/C122S o Y40Q/V41L/L97bA o Y40Q/V41R/L97bA, y aquellos que contienen la secuencia de residuos de aminoácidos

expuesta en cualquiera de SEQ ID NO:21 y 40-44 y porciones catalíticamente activas de las mismas, así como formas modificadas de los mismos. El tratamiento se puede repetir múltiples veces, tal como una vez al día. Los usos de los polipéptidos de u-PA modificados y formas modificadas de los mismos para tratamiento de AMD o DGF se proporcionan. Los polipéptidos de u-PA modificados incluyen cualquiera descrito en la presente, incluidos aquellos que contienen los reemplazos R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R o R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R o Y40Q/V41L/L97bA/C122S o Y40Q/V41R/L97bA/C122S o Y40Q/V41L/L97bA o Y40Q/V41R/L97bA, y formas modificadas de los mismos que están PEGiladas o que son proteínas de fusión como se describe en la presente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **FIGURA 1** ilustra una descripción general de las vías clásica, de lectina y alternativa de complemento y la activación de complejo de complemento terminal, el complejo de ataque de membrana (MAC). La figura representa muchas de las más de 30 proteínas que participan en la cascada de complemento, su acción dentro de la cascada y, cuando corresponde, sus puntos de convergencia entre las vías de complemento. Por ejemplo, las tres vías convergen en la generación de una C3-convertasa, que escinde C3 para formar una C5-convertasa que produce la formación del complejo MAC. La figura también representa la generación de muchos de los productos de escisión de complemento.

Las **FIGURAS 2A-2B** son vistas esquemáticas de proteínas de fusión de u-PA N-terminales. La FIGURA 2A es una vista esquemática de proteínas de fusión de u-PA N-terminales que contienen el extremo N-terminal del compañero de fusión (es decir, Fc) al dominio catalítico de u-PA. Una proteína de fusión N-terminal de ejemplo se expone en SEQ ID NO:1004, que contiene secuencia de señal kappa (κ) de cadena ligera de inmunoglobulina humana, Fc (compañero de fusión), AGS (ligador), secuencia de activación de u-PA y un dominio catalítico de u-PA modificado. La FIGURA 2B es una vista esquemática de proteína tipo silvestre N-terminal que no contiene un compañero de fusión. Una proteína tipo silvestre N-terminal se expone en SEQ ID NO:1005, que contiene secuencia de señal kappa (κ) de cadena ligera de inmunoglobulina humana, el extremo N-terminal de u-PA, secuencia de activación de u-PA y un dominio catalítico de u-PA modificado.

Las **FIGURAS 3A-3C** son vistas esquemáticas de proteínas de fusión de u-PA C-terminales. La FIGURA 3A es una vista esquemática de proteínas de fusión de u-PA C-terminales que contienen el compañero de fusión C-terminal al dominio catalítico de u-PA donde la proteína de fusión carece de una secuencia de activación N-terminal al dominio

catalítico de u-PA. Una proteína de fusión C-terminal de ejemplo se expone en SEQ ID NO:1006, que contiene una secuencia de señal de IL2 humana (hIL2SP), un dominio catalítico de u-PA modificado, un ligador y Fc (compañero de fusión). Otra proteína de fusión C-terminal de ejemplo se expone en SEQ ID NO:1007, que contiene una secuencia de señal de IL2 humana (hIL2SP), un dominio catalítico de u-PA modificado, un ligador y HSA (albúmina de suero humano como compañero de fusión). Otra proteína de fusión C-terminal de ejemplo se expone en SEQ ID NO:1008, que contiene una secuencia de señal de IL2 humana (hIL2SP), un dominio catalítico de u-PA modificado, un ligador y un scFv que se une a colágeno II (C2scFv) (compañero de fusión). Otra proteína de fusión C-terminal de ejemplo se expone en SEQ ID NO:1009, que contiene una secuencia de señal de IL2 humana (hIL2SP), un dominio catalítico de u-PA modificado, un ligador y un HABD (dominio de unión a ácido hialurónico (compañero de fusión). Otra proteína de fusión C-terminal de ejemplo se expone en SEQ ID NO:1012, que contiene una secuencia de señal de IL2 humana (hIL2SP), el dominio catalítico de u-PA tipo silvestre, un ligador y Fc (compañero de fusión). Otra proteína de fusión C-terminal de ejemplo se expone en SEQ ID NO:1013, que contiene una secuencia de señal de IL2 humana (hIL2SP), el dominio catalítico u-PA tipo silvestre, un ligador y HSA (compañero de fusión). La FIGURA 3B es una vista esquemática de proteínas de fusión de u-PA C-terminales que contienen el compañero de fusión (es decir, Fc o HSA) C-terminal al dominio catalítico u-PA. Una proteína de fusión C-terminal de ejemplo se expone en SEQ ID NO:1010, que contiene una secuencia de señal kappa (κ) de cadena ligera de inmunoglobulina humana, un sitio de activación de furina, un dominio catalítico de u-PA modificado, un ligador y Fc (compañero de fusión). Otra proteína de fusión C-terminal de ejemplo se expone en SEQ ID NO:1016, que contiene una secuencia de señal kappa (κ) de cadena ligera de inmunoglobulina humana, una secuencia de activación de furina, un dominio catalítico de u-PA modificado, un ligador y HSA (compañero de fusión). La FIGURA 3C es una vista esquemática de proteínas de fusión de u-PA que contienen un compañero de fusión (es decir, Fc o HSA) C-terminal al dominio catalítico de u-PA y un compañero de fusión (es decir, el extremo N-terminal tipo silvestre de u-PA) para el dominio catalítico de u-PA. Una proteína de fusión de ejemplo se expone en SEQ ID NO:1011, que contiene una secuencia de señal kappa (κ) de cadena ligera de inmunoglobulina humana, el dominio N-terminal de u-PA, un dominio catalítico de u-PA modificado, un ligador y Fc (compañero de fusión). Otra proteína de fusión C-terminal de ejemplo se expone en SEQ ID NO:1014, que contiene una secuencia de señal kappa (κ) de cadena ligera de inmunoglobulina humana, la región N-terminal de u-PA, un sitio de activación de furina, un dominio catalítico de u-PA modificado, un ligador y HSA (compañero de fusión). Otra proteína de fusión C-terminal de ejemplo se expone en SEQ ID

NO:1015, que contiene una secuencia de señal kappa (κ) de cadena ligera de inmunoglobulina humana, la región N-terminal de u-PA, la secuencia de activación de u-PA, un dominio catalítico de u-PA modificado, un ligador y HSA (compañero de fusión).

Las **FIGURAS 4A-4H** son vistas esquématicas de las formas activadas de las proteínas de fusión, donde SPD se refiere al dominio de serina-proteasa (los dominios de proteasa polipeptídica de u-PA modificados proporcionados en la presente; el extremo N-terminal de u-PA se refiere en general a los residuos 1-178 de u-PA o cualquier forma modificada de los mismos. La FIGURA 4A es una vista esquemática de la proteína de fusión de SEQ ID NO: 1010, que contiene un dominio Fc en el extremo C-terminal del dominio de proteasa de u-PA (SEQ ID NO: 21) y una secuencia de activación de furina, donde el enlace de disulfuro entre los dominios Fc forma un dímero. La FIGURA 4B es una vista esquemática de la proteína de fusión de SEQ ID NO: 1011, que contiene un dominio Fc en el extremo C-terminal del dominio de proteasa de u-PA (SEQ ID NO: 987), y el extremo N-terminal de u-PA y la secuencia de activación de u-PA en el extremo N-terminal de la proteína, donde el enlace de disulfuro entre los dominios Fc forma un dímero. La FIGURA 4C es una vista esquemática de la proteína de fusión expuesta en SEQ ID NO: 1036, que contiene un dominio Fc en el extremo C-terminal del dominio de proteasa de u-PA (SEQ ID NO: 987), y el extremo N-terminal de u-PA y una secuencia de activación de furina en el extremo N-terminal de la proteína de fusión, donde el enlace de disulfuro entre los dominios Fc forma un dímero. La FIGURA 4D es una vista esquemática de la proteína de fusión expuesta en SEQ ID NO: 1014, que contiene HSA en el extremo C del dominio de proteasa de u-PA (SEQ ID NO: 987), y el extremo N-terminal de u-PA y una secuencia de activación de furina en el extremo N-terminal de la proteína de fusión. La FIGURA 4E es una vista esquemática de la proteína de fusión expuesta en SEQ ID NO: 1015, que contiene HSA en el extremo C del dominio de proteasa de u-PA (SEQ ID NO: 987), y el extremo N-terminal de u-PA y la secuencia de activación de u-PA en el extremo N-terminal de la proteína de fusión. La FIGURA 4F es una vista esquemática de la proteína de fusión expuesta en SEQ ID NO: 1016, que contiene HSA en el extremo C del dominio de proteasa de u-PA (SEQ ID NO: 21) y una secuencia de activación de furina N-terminal al dominio de proteasa. La FIGURA 4F es una vista esquemática de la proteína de fusión expuesta en SEQ ID NO: 1017, que contiene HSA en el extremo C del dominio de proteasa de u-PA (SEQ ID NO: 21) y una secuencia de activación de SUMO N-terminal al dominio de proteasa. La FIGURA 4H es una vista esquemática de la proteína de fusión expuesta en SEQ ID NO: 1018, que contiene un dominio Fc en el extremo C-terminal del dominio de proteasa de u-PA (SEQ ID NO: 21) y el extremo N-terminal de u-PA y una secuencia de activación de SUMO N-terminal al dominio de proteasa, donde un enlace de

disulfuro entre los dominios Fc forma un dímero.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Esquema

A. DEFINICIONES

B. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE u-PA

1. Serina Proteasas

2. Estructura

3. Función/actividad

C. INHIBICIÓN DE COMPLEMENTO MEDIANTE EL DIRECCIONAMIENTO HACIA C3

1. Proteína C3 de complemento y su papel en la iniciación de complemento

a. Vía clásica

b. Vía alternativa

c. Vía de Lectina

d. Funciones efectoras mediadas por complemento

i. Lisis mediada por complemento: Complejo de Ataque de Membrana

ii. Inflamación

iii. Quimiotaxis

iv. Opsonización

v. Activ ación de la Respuesta Inmunitaria Humoral

2. Estructura y Función de C3

a. C3a

b. C3b

c. Inhibidores de C3b

D. POLIPÉPTIDOS DE U-PA MODIFICADOS QUE ESCINDEN C3

1. Polipéptidos de u-PA modificados de ejemplo

2. Modificaciones adicionales

a. Inmunogenicidad disminuida

b. Dominio Fc

c. Conjugación con polímeros

d. Dominio de transducción de proteínas

E. ENSAYOS PARA VALORAR O MONITOREAR LA ACTIVIDAD DE u-PA EN LAS

FUNCIONES MEDIADAS POR COMPLEMENTO

1. Métodos para valorar la actividad de u-PA en la función de la proteína C3 de complemento

a. Detección de proteínas

i. Análisis SDS-PAGE

ii. Inmunoensayo Enzimático

iii. Inmunodifusión Radial (RID)

b. Ensayos Hemolíticos

c. Métodos para determinar los sitios de escisión

2. Métodos para valorar la actividad de u-PA tipo silvestre

a. Escisión de plasminógeno

b. Ensayos de Activación de Plasminógeno

c. Ensayos de Unión de u-PA-uPAR

d. Escosición de C3

ACC-AGR + ELISA

Valoración de especificidad utilizando bibliotecas de péptidos

3. Especificidad

4. Modelos de Enfermedades

F. MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAN PARA POLIPÉPTIDOS DE U-PA MODIFICADOS DE LOS MISMOS

1. Aislamiento o Preparación de Ácidos Nucleicos que Codifican para Polipéptidos de u-PA

2. Generación de ácidos nucleicos mutantes o modificados y polipéptidos codificadores

3. Vectores y Células

4. Expresión

a. Células procariotas

b. Células de levadura

c. Insectos y células insectiles

d. Expresión mamífera

e. Plantas

5. Purificación

6. Modificaciones adicionales

a. PEGilación

b. Proteínas de fusión y otros conjugados

7. Moléculas de ácido nucleico

G. COMPOSICIONES, FORMULACIONES Y DOSIS

1. Administración de polipéptidos de u-PA modificados

2. Administración de ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos de u-PA modificados (terapia génica)

H. USOS TERAPÉUTICOS Y MÉTODOS DE TRATAMIENTO

1. Enfermedad mediada por la activación del complemento

a. Artritis reumatoide

b. Sepsis

c. Esclerosis múltiple

d. Enfermedad de Alzheimer

e. Lesión por Isquemia-Reperfusión

f. Trastornos oculares

Degeneración macular relacionada con la edad (ADM)

g. Trasplante de órganos y función retardada de injerto (DGF)

2. Usos Terapéuticos

a. Enfermedad inflamatoria mediada por el sistema inmunológico

b. Enfermedad Neurodegenerativa

c. Enfermedades cardiovasculares

e. Trasplante de órganos

Función retardada de injerto (DGF)

3. Terapia de combinación

I. EJEMPLOS

A. DEFINICIONES

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que se entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Todas las patentes, solicitudes de patente, solicitudes y publicaciones publicadas, secuencias de GENBANK, sitios web y otros materiales publicados a los que se hace referencia en toda la descripción en la presente, a menos que se indique lo contrario, se incorporan a la presente por referencia en su totalidad. En el caso de que haya una pluralidad de definiciones para los términos en la presente, prevalecerán las de esta sección. Cuando se hace referencia a una URL u otro identificador o

dirección, se entiende que estos identificadores pueden cambiar y la información particular en Internet puede ir y venir, pero se conoce información equivalente y se puede acceder fácilmente, tal como mediante la búsqueda en Internet y/o bases de datos apropiadas. La referencia a la misma pone de manifiesto la disponibilidad y difusión pública de esa información.

Como se usa en la presente, la escisión se refiere a la ruptura de enlaces peptídicos por una proteasa. El motivo del sitio de escisión para una proteasa implica residuos N- y C-terminal al enlace escindible (los lados cebado y no cebado, respectivamente, con el sitio de escisión para una proteasa definido como... P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'..., y la escisión se produce entre los residuos P1 y P1'). En C3 humana, la escisión por una C3-convertasa se presenta entre los residuos R y S (ver residuos 746-751 de SEQ ID NO: 47, escisión entre los residuos 748 y 749 en C3 humana) de C3:

P3	P2	P1		P1'	P2'	P3'
Leu	Ala	Arg	↓	Ser	Asn	Leu

Habitualmente, la escisión de un sustrato en una vía bioquímica es una escisión activadora o una escisión inhibidora. Una escisión activadora se refiere a la escisión de un polipéptido de una forma inactiva a una forma activa. Esto incluye, por ejemplo, escisión de un zimógeno a una enzima activa. Una escisión activadora también es una escisión por la cual una proteína se escinde en una o más proteínas que tienen actividad. Por ejemplo, el sistema de complemento es una cascada irreversible de eventos de escisión proteolítica cuya terminación da como resultado la formación de múltiples moléculas efectoras que estimulan la inflamación, facilitan la fagocitosis del antígeno y lisan algunas células directamente. Por lo tanto, la escisión de C3 por una C3-convertasa en C3a y C3b es una escisión de activación. Por el contrario, los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente efectúan la escisión inhibitoria de C3, tal como por escisión en el sitio activo.

Como se usa en la presente, una escisión inhibitoria o escisión de inactivación es la escisión de una proteína en uno o más productos de degradación que no son funcionales. La escisión inhibitoria de por resultado la disminución o reducción de una actividad de una proteína. Habitualmente, una reducción de una actividad de una proteína reduce la vía o proceso para el cual la proteína está involucrada. En un ejemplo, la escisión de cualquiera de una o más proteínas de complemento que es una escisión inhibitoria da como resultado la reducción o inhibición concomitante de cualquiera de una o más de las vías funcionales clásica, de lectina o alternativa del complemento. Para ser inhibitoria, la escisión reduce la actividad en al menos o al menos aproximadamente 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más en comparación con una forma natural de la proteína.

El por ciento de escisión de una proteína que se requiere para que la escisión sea inhibitoria varía entre proteínas, pero se puede determinar mediante el ensayo de una actividad de la proteína.

Como se usa en la presente, “activación del complemento” se refiere a la activación de las vías de complemento, por ejemplo, activación del complemento se refiere a un aumento en las funciones o actividades de cualquiera o más de las vías de complemento por una proteasa o un aumento en la actividad de cualquiera de las proteínas en la vía de complemento. La activación del complemento puede conducir a la lisis celular mediada por complemento o puede conducir a la destrucción celular o tisular. La activación inadecuada de complemento en el tejido hospedador juega un papel importante en la patología de muchas enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias, y también es responsable o está asociada con muchos estados de enfermedad asociados con la bioincompatibilidad. Se entiende que la activación puede significar un aumento en la actividad existente, así como la inducción de una nueva actividad. Se puede producir una activación del complemento *in vitro* o *in vivo*. Los ejemplos de funciones de complemento que se pueden analizar y que se describen en la presente incluyen ensayos hemolíticos y ensayos para medir cualquiera o más de las moléculas efectoras de complemento, tal como por SDS PAGE seguida de tinción con transferencia Western o Azul Brillante Coomassie o por ELISA. En algunas modalidades, la activación del complemento se inhibe por una proteasa, tal como una proteasa descrita en la presente, por 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% o más en comparación con la actividad de complemento en ausencia de una proteasa.

Como se usa en la presente, “inhibir la activación del complemento” o “inactivación del complemento” se refiere a la reducción o disminución de una función o actividad mediada por complemento de cualquiera o más de las vías de complemento por una proteasa o en la actividad de cualquiera de las proteínas en una vía. Una función o actividad de complemento se puede presentar *in vitro* o *in vivo*. Los ejemplos de funciones de complemento que se pueden analizar y que se describen en la presente incluyen ensayos hemolíticos y ensayos para medir cualquiera o más de las moléculas efectoras de complemento, tal como por SDS PAGE seguida de tinción con transferencia Western o Azul Brillante Coomassie o por ELISA. Una proteasa puede inhibir la activación del complemento en 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más. En otras modalidades, una proteasa inhibe la activación del complemento en 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% o más en comparación con la actividad de complemento en ausencia de una proteasa.

Como se usa en la presente, una "proteína de complemento" o un “componente de complemento” es una proteína del sistema de complemento que funciona en la defensa del

huésped contra infecciones y en el proceso inflamatorio. Las proteínas de complemento incluyen aquellas que funcionan en la vía clásica, aquellas que funcionan en la vía alternativa y aquellas que funcionan en la vía de lectina. Entre las proteínas de complemento se encuentran las proteasas que participan en las vías de complemento.

Como se usa en la presente, las proteínas de complemento incluyen cualquiera de los "productos de escisión" (también denominados "fragmentos") que se forman después de la activación de la cascada de complemento. También se incluyen entre las proteínas de complemento formas inactivas o alteradas de proteínas de complemento, tal como iC3b y C3a-desArg. Por lo tanto, las proteínas de complemento incluyen, pero no se limitan a: C1q, C1r, C1s, C2, C3, C3a, C3b, C3c, C3dg, C3g, C3d, C3f, iC3, C3a-desArg, C4, C4a, C4b, iC4, C4a-desArg, C5, C5a, C5a-des-Arg, C6, C7, C8, C9, MASP-1, MASP-2, MBL, Factor B, Factor D, Factor H, Factor I, CR1, CR2, CR3, CR4, properdina, C1Inh, C4bp, MCP, DAF, CD59 (MIRL), clusterina y HRF y variantes alélicas y de especies de cualquier proteína de complemento.

Como se usa en la presente, una forma "natural" de una proteína de complemento es una que se puede aislar de un organismo tal como un vertebrado en ausencia de activación del complemento y que no ha sido modificada intencionalmente por el hombre en el laboratorio. Los ejemplos de proteínas de complemento nativas incluyen C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4, Factor B, Factor D, properdina, C5, C6, C7, C6 y C9.

En general, las "proteínas de complemento nativas" están inactivas y adquieren actividad tras la activación. La activación puede requerir escisión de activación, escisión de maduración y/o formación de complejos con otras proteínas. Una excepción a esto es el Factor I y el Factor D que tienen actividad de enzima en su forma nativa. En algunos ejemplos, la activación de una proteína de complemento natural se presenta después de la escisión de la proteína. Por ejemplo, los zimógenos de complemento tal como C3 son proteasas que se activan a sí mismas por escisión de proteasa de modo que la escisión de C3 por la C3-convertasa C4b2b genera los fragmentos activos C3a y C3b. En otro ejemplo, la escisión de una proteína de complemento natural inactiva da como resultado cambios en la estabilidad estructural de una proteína que dan como resultado la activación de la proteína. Por ejemplo, C3 contiene un enlace tioéster interno que en la proteína natural es estable, pero se puede volver altamente reactivo y activarse luego de cambios conformacionales que resultan de la escisión de la proteína. Por lo tanto, los productos de escisión de C3 son biológicamente activos. La activación de C3 también se puede presentar espontáneamente en la ausencia de escisión. Es la conversión espontánea del enlace de tioéster en C3 natural lo que es un evento iniciador de la vía alternativa del complemento. En otro ejemplo, la activación de una proteína

de complemento natural se presenta después de la liberación de una molécula reguladora compleja que inhibe la actividad de una proteína de complemento natural de otro modo activa. Por ejemplo, C1inh se une a y inactiva C1s y C1r, a menos que estén en complejo con C1q.

Como se usa en la presente, "escisión por maduración" es un término general que se refiere a cualquier escisión necesaria para la activación de un zimógeno. Esto incluye la escisión que conduce a un cambio conformacional que resulta en actividad (es decir, escisión de activación). También incluye escisión en la cual un sitio de unión crítico se expone o un impedimento estérico se expone o un segmento inhibidor se retira o se mueve.

Como se usa en la presente, "forma alterada" de una proteína de complemento se refiere a una proteína de complemento que está presente en una forma no natural que resulta de modificaciones en su estructura molecular. Por ejemplo, la reacción de C3 del tioéster con agua se puede presentar en ausencia de escisión de convertasa, dando una forma inactiva hidrolizada de C3 denominada iC3. En otro ejemplo, las anafilatoxinas incluidas C3a, C5a y C4a se pueden desarginar mediante carboxipeptidasa N en formas más estables y menos activas.

Como se usa en la presente, un "fragmento" o “producto de escisión” de una proteína de complemento es una región o segmento de una proteína de complemento que contiene una porción de la secuencia de polipéptido de una proteína de complemento nativa. Un fragmento de una proteína de complemento usualmente resulta después de la activación de una cascada de complemento. En general, un fragmento resulta de la escisión proteolítica de una proteína de complemento natural. Por ejemplo, la proteína C3 de complemento se escinde enzimáticamente mediante una C3-convertasa, lo que da como resultado dos fragmentos: C3a que constituye la porción N-terminal de C3; y C3b que constituye la porción C-terminal y contiene el sitio de serina proteasa. Un fragmento de una proteína de complemento también resulta de la escisión proteolítica de otro fragmento de una proteína de complemento. Por ejemplo, C3b, un fragmento generado a partir de la escisión de C3, se escinde por el Factor I para generar los fragmentos iC3b y C3f. En general, los productos de escisión de proteínas de complemento son productos biológicamente activos y funcionan como moléculas efectoras de escisión del sistema de complemento. Por lo tanto, un fragmento o porción de proteína de complemento incluye productos de escisión de proteínas de complemento y también porciones de las proteínas que retienen o exhiben al menos una actividad de una proteína de complemento.

Como se usa en la presente, “moléculas efectoras de escisión” o “proteínas efectoras de escisión” se refiere a los productos de escisión activa generados como resultado de la cascada de enzimas activadas del sistema de complemento. Una molécula efectora de

escisión, un fragmento o un producto de escisión resultante de la activación del complemento puede contribuir a cualquiera de una o más de las funciones o actividades mediadas por el complemento, incluidas opsonización, anafilaxia, lisis celular e inflamación. Los ejemplos de escisión o moléculas efectoras incluyen, pero no se limitan a, C3a, C3b, C4a, C4b, C5a, C5b-9 y Bb. Las moléculas efectoras de escisión del sistema de complemento, en virtud de la participación en la cascada, exhiben actividades que incluyen estimular la inflamación, facilitar la fagocitosis del antígeno y lisar algunas células directamente. Los productos de escisión de complemento promueven o participan en la activación de las vías de complemento.

Como se usa en la presente, "anafilatoxinas" son proteínas efectoras de escisión que desencadenan la desgranulación o liberación de sustancias de, células cebadas o basófilos, que participan en la respuesta inflamatoria, particularmente como parte de la defensa contra parásitos. Si la desgranulación es demasiado fuerte, puede provocar reacciones alérgicas. Las anafilatoxinas incluyen, por ejemplo, C3a, C4a y C5a. Las anafilatoxinas también median indirectamente espasmos de células del músculo liso (como broncoespasmos), aumentos en la permeabilidad de los capilares sanguíneos y quimiotaxis.

Como se usa en la presente, "quimiotaxis" se refiere al movimiento mediado por receptor de leucocitos hacia un quimioatrayente habitualmente en la dirección de la concentración creciente de este, tal como en la dirección de la concentración creciente de una anafilatoxina.

Como se usa en la presente, "opsonización" se refiere a la alteración de la superficie de un patógeno u otra partícula para que pueda ser ingerida por fagocitos. Una proteína que se une o altera la superficie de un patógeno se denomina opsonina. Las proteínas de complemento y anticuerpo opsonizan bacterias extracelulares para su absorción y destrucción por fagocitos tal como neutrófilos y macrófagos.

Como se usa en la presente, "lisis celular" se refiere a la ruptura abierta de una célula mediante la destrucción de su pared o membrana. La hemólisis de glóbulos rojos es una medida de la lisis celular.

Como se usa en la presente, “proteína C3 de complemento” o “C3” se refiere a la proteína C3 de complemento del sistema de complemento que funciona en la defensa del hospedador contra infecciones y en el proceso inflamatorio. La proteína C3 de complemento, humana, es una pre-proproteína o zimógeno de cadena simple de 1663 aminoácidos expuestos en SEQ ID NO:47 que contiene un péptido de señal de 22 aminoácidos (aminoácidos 1-22 de SEQ ID NO:47) y una secuencia de tetra-arginina (aminoácidos 678-671 de SEQ ID NO:47) que se elimina mediante una enzima similar a furina que da por resultado una proteína madura de dos cadenas que contiene una cadena beta (aminoácidos

23-667 de SEQ ID NO:47) y una cadena alfa (aminoácidos 672-1663 de SEQ ID NO:47) unida por un enlace de disulfuro entre los residuos C559 y C816. La proteína C3 de complemento se activa adicionalmente la escisión proteolítica por una C3-convertasa (C4b2b o C3bBb) entre los aminoácidos 748 y 749 de SEQ ID NO:47 que genera la anafilatoxina C3a y la opsonina C3b.

Como se usa en la presente, un "zimógeno" se refiere a una proteína que se activa mediante escisión proteolítica, que incluye escisión de maduración, tal como escisión de activación, y/o formación de complejo con otras proteínas y/o cofactores. Un zimógeno es un precursor inactivo de una proteína. Estos precursores son en general más grandes, aunque no necesariamente más grandes, que la forma activa. Con referencia a u-PA o proteína C3 de complemento, los zimógenos se convierten en enzimas activas mediante escisión específica, incluida la escisión catalítica y autocatalítica, o mediante la unión de un cofactor activador, que genera una enzima activa. Un zimógeno, de esta manera, es una proteína enzimáticamente inactiva que se convierte en una enzima proteolítica por la acción de un activador. La escisión se puede efectuar de forma autocatalítica. Varias proteínas de complemento son zimógenos; están inactivas, pero se escinden y activan al inicio del sistema de complemento después de la infección. Los zimógenos, en general, son inactivos y se pueden convertir en polipéptidos activos maduros mediante escisión catalítica o autocatalítica de la prorregión del zimógeno.

Como se usa en la presente, una “prorregión”, “propéptido” o “pro-secuencia" se refiere a una región o un segmento de una proteína que se escinde para producir una proteína madura. Esto puede incluir segmentos que funcionan para suprimir la actividad de enzima al enmascarar la maquinaria catalítica y así prevenir la formación del compuesto intermedio catalítico (es decir, al ocluir estéricamente el sitio de unión al sustrato). Una prorregión es una secuencia de aminoácidos posicionada en el extremo amino de un polipéptido biológicamente activo maduro y puede ser tan pequeña como unos pocos aminoácidos o puede ser una estructura multidominio.

Como se usa en la presente, una “secuencia de activación” se refiere a una secuencia de aminoácidos en un zimógeno que es el sitio necesario para la escisión de activación o escisión de maduración para formar una proteasa activa. La escisión de una secuencia de activación se puede catalizar de forma autocatalítica o mediante compañeros de activación. La escisión de activación es un tipo de escisión de maduración en la que se produce un cambio conformacional requerido para la actividad. Esta es una vía de activación clásica, por ejemplo, para serina-proteasas en la que una escisión genera un nuevo extremo N-terminal que interactúa con las regiones conservadas de la maquinaria catalítica, tal como

residuos catalíticos, para inducir cambios conformacionales necesarios para la actividad. La activación puede dar como resultado la producción de formas de múltiples cadenas de las proteasas. En algunos casos, las formas de cadena individual de la proteasa pueden exhibir actividad proteolítica.

Como se usa en la presente, "dominio" se refiere a una porción de una molécula, tal como proteínas o ácidos nucleicos codificantes, que es estructural y/o funcionalmente distinta de otras porciones de la molécula y es identificable. Un dominio de polipéptido de ejemplo es una parte del polipéptido que puede formar una estructura doblada independientemente dentro de un polipéptido compuesto por uno o más motivos estructurales (por ejemplo, combinaciones de hélices alfa y/o hebras beta conectadas por regiones de bucle) y/o que se reconoce por una actividad funcional particular, tal como actividad de enzima, dimerización o unión al sustrato. Un polipéptido puede tener uno o más dominios distintos, habitualmente más de uno. Por ejemplo, el polipéptido puede tener uno o más dominios estructurales y uno o más dominios funcionales. Un dominio de polipéptido individual se puede distinguir en función de la estructura y función. Un dominio puede abarcar una secuencia lineal contigua de aminoácidos. De manera alternativa, un dominio puede abarcar múltiples porciones de aminoácidos no contiguas, que no son contiguas a lo largo de la secuencia lineal de aminoácidos del polipéptido. Habitualmente, un polipéptido contiene una pluralidad de dominios. Por ejemplo, las serina-proteasas se pueden caracterizar en función de la secuencia de dominios de proteasa. Los expertos en la técnica están familiarizados con dominios de polipéptido y pueden identificarlos en virtud de la homología estructural y/o funcional con otros dominios de este tipo. Para ejemplificar en la presente, se proporcionan definiciones, pero se entiende que está dentro del experto en la técnica reconocer dominios particulares por nombre. Si es necesario, se puede emplear el software apropiado para identificar dominios.

Como se usa en la presente, una "región estructural" de un polipéptido es una región del polipéptido que contiene al menos un dominio estructural.

Como se usa en la presente, un “dominio de proteasa” es la porción catalíticamente activa de una proteasa. La referencia a un dominio de proteasa de una proteasa incluye las formas individuales, de dos y múltiples cadenas de cualquiera de estas proteínas. Un dominio de proteasa de una proteína contiene todas las propiedades requeridas de esa proteína requeridas para su actividad proteolítica, tal como, por ejemplo, su centro catalítico.

Como se usa en la presente, una “porción catalíticamente activa” o “dominio catalíticamente activo” de una proteasa, por ejemplo, un polipéptido de u-PA, se refiere al dominio de proteasa, o cualquier fragmento o porción del mismo que retenga la actividad de

proteasa. Por ejemplo, una porción catalíticamente activa de un polipéptido de u-PA puede ser un dominio de proteasa de u-PA que incluye una forma de cadena individual aislada del dominio de proteasa o una forma de cadena doble activada. De manera significativa, al menos *in vitro*, las formas de cadena individual de las proteasas y dominios catalíticos o porciones proteolíticamente activas de las mismas (habitualmente truncamientos en el extremo C-terminal) exhiben actividad de proteasa.

Como se usa en la presente, un "ácido nucleico que codifica para un dominio de proteasa o porción catalíticamente activa de una proteasa" se refiere a un ácido nucleico que codifica solo para el dominio de proteasa de cadena individual mencionado o porción activa del mismo, y no las otras porciones contiguas de la proteasa como una secuencia continua.

Como se usa en la presente, la mención de que un polipéptido consiste esencialmente en el dominio de proteasa significa que la única porción del polipéptido es un dominio de proteasa o una porción catalíticamente activa del mismo. El polipéptido puede opcionalmente, y en general incluye secuencias adicionales no derivadas de proteasa de aminoácidos.

Como se usa en la presente, un "sitio activo de una proteasa" se refiere al sitio de unión al sustrato donde se produce la catálisis del sustrato. La estructura y propiedades químicas del sitio activo permiten el reconocimiento y unión del sustrato y posterior hidrólisis y escisión del enlace escindible en el sustrato. El sitio activo de una proteasa contiene aminoácidos que contribuyen al mecanismo catalítico de escisión peptídica, tal como los aminoácidos Gln His Ala Arg Ala Ser His Leu (sitio activo de C3; residuos 737-744 de SEQ ID NO:47), así como aminoácidos que contribuyen al reconocimiento de secuencia de sustrato, tal como aminoácidos que contribuyen a la especificidad de unión de sustrato extendida. Por ejemplo, la escisión en el sitio activo de C3 puede inhibir su actividad, tal como:

Q H A R↓A S H L (residuos 737-744 de SEQ ID NO:47)

P4 P3 P2 P1 ↓P1' P2' P3' P4'.

Como se usa en la presente, el "sitio de reconocimiento de sustrato" o "secuencia de escisión" se refiere a la secuencia reconocida por el sitio activo de una proteasa que se escinde por una proteasa. Habitualmente, una secuencia de escisión para una serina proteasa tiene seis residuos de longitud para coincidir con la especificidad de sustrato extendida de muchas proteasas, pero puede ser más larga o más corta dependiendo de la proteasa. Habitualmente, por ejemplo, para una serina proteasa, una secuencia de escisión se compone de los aminoácidos P1-P4 y P1'-P4' en un sustrato, donde la escisión se presenta después de la posición P1. Habitualmente, una secuencia de escisión para una serina proteasa tiene seis residuos de longitud para coincidir con la especificidad de sustrato extendida de muchas

proteasas, pero puede ser más larga o más corta dependiendo de la proteasa.

Como se usa en la presente, “sustrato diana” se refiere a un sustrato que se escinde por una proteasa. Habitualmente, el sustrato diana se escinde específicamente en su sitio de reconocimiento de sustrato mediante una proteasa. De forma mínima, un sustrato diana incluye los aminoácidos que conforman la secuencia de escisión. Opcionalmente, un sustrato diana incluye un péptido que contiene la secuencia de escisión y cualquier otro aminoácido. Una proteína de longitud completa, variante alélica, isoforma o cualquier porción de la misma, que contiene una secuencia de escisión reconocida por una proteasa, es un sustrato diana para esa proteasa. Por ejemplo, para propósitos en la presente en los que se pretende la inactivación del complemento, un sustrato diana es la proteína C3 de complemento, o cualquier porción o fragmento de la misma que contenga una secuencia de escisión reconocida por un polipéptido de u-PA. Estos sustratos diana pueden ser proteínas purificadas, o pueden estar presentes en una mezcla, tal como una mezcla *in vitro* o una mezcla *in vivo*. Las mezclas pueden incluir, por ejemplo, sangre o suero u otros fluidos tisulares. Adicionalmente, un sustrato diana incluye un péptido o proteína que contiene una porción adicional que no afecta la escisión del sustrato por una proteasa. Por ejemplo, un sustrato diana puede incluir un péptido de cuatro aminoácidos o una proteína de longitud completa unida químicamente a una porción fluorogénica. Las proteasas se pueden modificar para exhibir una mayor especificidad de sustrato para un sustrato diana.

Como se usa en la presente, “u-PA” o “uPA” o “polipéptido de u-PA” se refiere a cualquier polipéptido de u-PA incluidos, pero no se limitados a, un polipéptido producido recombinantemente, un polipéptido producido sintéticamente y un polipéptido de u-PA extraído o aislado de células o tejidos incluidos, pero no se limitados a, hígado y sangre. Los nombres alternativos que se utilizan indistintamente para u-PA incluyen uroquinasa y activador de plasminógeno urinario y activador de plasminógeno de uroquinasa y activador de plasminógeno tipo urinario y activador de plasminógeno tipo uroquinasa. u-PA incluye polipéptidos relacionados de diferentes especies incluidas, pero no se limitan a, animales de origen humano y no humano. El u-PA humano incluye u-PA, variantes alélicas, isoformas, moléculas sintéticas de ácidos nucleicos, proteína aislada de células y tejidos humanos y formas modificadas de los mismos. Los polipéptidos de u-PA humanos de ejemplo no modificados incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de u-PA maduros naturales no modificados y tipo silvestre (SEQ ID NO:3), el polipéptido de u-PA precursor no modificado y tipo silvestre que incluye un propéptido y/o péptidos de señal (tal como el polipéptido de u-PA expuesto en SEQ ID NO:1) y el dominio de proteasa (tal como el dominio de proteasa de u-PA expuesto en SEQ ID NO: 2). Un experto en la técnica reconocería que las posiciones

referenciadas del polipéptido de u-PA maduro (SEQ ID NO:3) difieren en 20 residuos de aminoácidos cuando se comparan con el polipéptido de u-PA precursor (SEQ ID NO:1), que es el polipéptido de u-PA que contiene la secuencia de péptidos de señal. De esta manera, el primer residuo de aminoácido de SEQ ID NO:3 “corresponde a” el vigésimo primer (21º) residuo de aminoácido de SEQ ID NO:1.

La cita de “u-PA” comprende la forma activada o de dos cadenas del polipéptido de u-PA que contiene la cadena A N-terminal (aminoácidos 1-158 de SEQ ID NO:3) y la cadena B C-terminal (aminoácidos 159-411 de SEQ ID NO:3) unida por un enlace de disulfuro entre los residuos 148C y 279C (correspondiente al polipéptido de u-PA maduro expuesto en SEQ ID NO:3). La forma de dos cadenas, o u-PA de alto peso molecular (HMW), se forma a partir de un polipéptido de u-PA maduro (por ejemplo, el expuesto en SEQ ID NO:3) mediante escisión proteolítica después del residuo de aminoácido Lys158 antes del residuo Ile159. La escisión proteolítica se puede llevar a cabo, por ejemplo, por plasmina, calicreína, catepsina B, matriptasa y factor de crecimiento nervioso gamma. Los polipéptidos de u-PA proporcionados en la presente se pueden modificar adicionalmente, tal como mediante modificación química o modificación postraduccional. Estas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, glicosilación, pegilación, albuminación, farnisilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación y otras modificaciones de polipéptidos conocidas en la técnica.

u-PA incluye u-PA de cualquier especie, incluidas especies humanas y no humanas. polipéptidos de u-PA de origen no humano incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de u-PA murinos, caninos, leporinos, aviares, bovinos, ovinos, porcinos y otros primates. Los polipéptidos de u-PA de origen no humano de ejemplo incluyen, por ejemplo, de ratón (*Mus musculus*, SEQ ID NO:52), rata (*Rattus norvegicus*, SEQ ID NO:53), vaca (*Bos taurus*, SEQ ID NO: 54), cerdo (*Sus scrofa*, SEQ ID NO: 55), conejo (*Oryctolagus cuniculus,* SEQ ID NO: 56), pollo (*Gallus gallus*, SEQ ID NO:57), babuino amarillo (*Papio cynocephalus*, SEQ ID NO: 58), orangután de Sumatra (*Pongo abelii*, SEQ ID NO: 59), perro (*Canis lupus*, SEQ ID NO: 60), oveja (*Ovis aries*, SEQ ID NO: 61), tití (*Callithrix jacchus*, SEQ ID NO: 62), macaco rhesus (*Macaca mulatta*, SEQ ID NO:63), gibón de mejilla blanca norte (*Nomascus leucogenys*, SEQ ID NO:64) y chimpancé (*Pan trodyglotes*, SEQ ID NO: 65).

La referencia a polipéptidos de u-PA también incluye polipéptidos precursores y polipéptidos de u-PA maduros en formas de cadena individual o dos cadenas, formas truncadas de los mismos que tienen actividad, el dominio de proteasa aislado e incluye variantes alélicas y variantes de especies, variantes codificadas por variantes de empalme, y otras variantes, incluyendo polipéptidos que tienen al menos o al menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más

identidad de secuencia con el polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO:1 o la forma madura del mismo (SEQ ID NO:3) o el dominio de proteasa del mismo (SEQ ID NO: 2). Los polipéptidos de u-PA incluyen, pero no se limitan a, isoformas específicas de tejido y variantes alélicas de los mismos, moléculas sintéticas preparadas mediante traducción de ácidos nucleicos, proteínas generadas mediante síntesis química, tal como síntesis que incluyen ligadura de polipéptidos más cortos, a través de métodos recombinantes, proteínas aisladas de células y tejido humano y no humano, polipéptidos de u-PA quiméricos y formas modificadas de los mismos. Los polipéptidos de u-PA también incluyen fragmentos o porciones de u-PA que son de longitud suficiente o incluyen regiones apropiadas para retener al menos una actividad (luego de la activación si es necesario) de un polipéptido maduro de longitud completa. En un ejemplo, la porción de u-PA es el dominio de proteasa, tal como, por ejemplo, el dominio proteasa expuesto en SEQ ID NO: 2 que corresponde a aminoácidos 179-431 de la secuencia de u-PA expuesta en SEQ ID NO: 1. Los polipéptidos de u-PA también incluyen aquellos que contienen modificaciones químicas o postraduccionales y aquellos que no contienen modificaciones químicas o postraduccionales. Estas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, pegilación, albuminación, glicosilación, farnilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación, HESilación (extensión de semivida mediante el acoplamiento de moléculas de fármaco al hidroxietil-almidón biodegradable (HES)), PASilación (conjugación mediante fusión genética o acoplamiento químico de compuestos farmacológicamente activos, tal como proteínas, péptidos y fármacos de bajo peso molecular, con polímeros biosintéticos desordenados nativamente hechos de los pequeños L-aminoácidos Pro, Ala y/o Ser) y otras modificaciones de polipéptido conocidas en la técnica.

Como se usa en la presente, “proteasa de u-PA” o “dominio de proteasa de u-PA” se refiere a cualquier polipéptido de u-PA que incluye, pero no se limita a, un polipéptido producido recombinantemente, un polipéptido producido sintéticamente y un polipéptido de u-PA extraído o aislado de células o tejidos que incluye, pero no se limita a, hígado y sangre. La proteasa de u-PA incluye polipéptidos relacionados de diferentes especies que incluyen, pero no se limita a animales de origen humano y no humano. Un dominio de proteasa de u-PA humana o proteasa de u-PA incluye u-PA, variantes alélicas, isoformas, moléculas sintéticas de ácidos nucleicos, proteína aislada de células y tejidos humanos y formas modificadas del mismo. Los dominios de proteasa de u-PA humana de referencia de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, dominio de proteasa de u-PA no modificado y tipo silvestre (SEQ ID NO:2) y un dominio de proteasa alternativo (tal como el dominio de proteasa de u-PA expuesto en SEQ ID NO: 5). Un experto en la técnica reconocería que las posiciones referenciadas del dominio de proteasa de u-PA (SEQ ID NO:2) difieren en 178 residuos de

aminoácidos cuando se comparan con el polipéptido de u-PA maduro (SEQ ID NO:1), que es el polipéptido de u-PA que contiene la secuencia WT de longitud completa. De esta manera, el primer residuo de aminoácido de SEQ ID NO:2 “corresponde a” el ciento setenta y nueve (179) residuo de aminoácido de SEQ ID NO:1.

Como se usa en la presente, una “modificación” se refiere a la modificación de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido o una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico e incluye deleciones, inserciones y reemplazos de aminoácidos o nucleótidos, respectivamente. Los métodos para modificar un polipéptido son rutinarios para los expertos en la técnica, tal como mediante el uso de metodologías de ADN recombinante. Existe una distinción entre modificaciones a la secuencia de aminoácidos del polipéptido y modificación del polipéptido. El primero se refiere a inserciones, deleciones y reemplazos o sustituciones de aminoácidos; el segundo a modificaciones del polipéptido, tal como modificaciones postraduccionales, PEGilación y otras modificaciones de proteínas para alterar propiedades y/o actividades.

Como se usa en la presente, “sustitución” o “reemplazo” se refiere al reemplazo de uno o más nucleótidos o aminoácidos en una secuencia de ácido nucleico o polipéptido natural, diana, tipo silvestre u otro con un nucleótido o aminoácido alternativo, sin cambiar la longitud (como se describe en varios residuos) de la molécula. De esta manera, una o más sustituciones en una molécula no cambian la cantidad de residuos de aminoácido o nucleótido de la molécula. Los reemplazos de aminoácidos en comparación con un polipéptido particular se pueden expresar en términos de la cantidad del residuo de aminoácido a lo largo de la longitud de la secuencia de polipéptido. Por ejemplo, un polipéptido modificado que tiene una modificación en el aminoácido en la 35ª posición de la secuencia de aminoácidos que es una sustitución/reemplazo de Arginina (Arg; R) con glutamina (Gln; Q) se puede expresar como R35Q, Arg35Gln, o 35Q. Simplemente R35 se puede usar para indicar que el aminoácido en la 35ª posición modificada es una arginina.

Como se usa en la presente, un “u-PA modificado” o “polipéptido de u-PA modificado” se refiere a una proteasa de u-PA que exhibe actividad alterada, tal como especificidad alterada de sustrato, en comparación con la forma no modificada. Estas proteasas incluyen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más modificaciones (es decir, cambios en aminoácidos) en comparación con un u-PA tipo silvestre, de modo que se altera una actividad, tal como especificidad o selectividad del sustrato, de la proteasa de u-PA para escindir la proteína C3 de complemento. Un u-PA modificado puede ser una proteasa de u-PA de longitud completa, o puede ser una porción de la misma de una proteasa de longitud completa, tal como el dominio de proteasa de u-PA, siempre que la

proteasa de u-PA modificada contenga modificaciones en regiones que alteren la actividad o especificidad de sustrato de la proteasa y la proteasa sea proteolíticamente activa. Una proteasa de u-PA modificada, o un dominio de proteasa de u-PA modificado, también puede incluir otras modificaciones en regiones que no afectan la especificidad de sustrato de la proteasa. Por lo tanto, un polipéptido de u-PA modificado habitualmente tiene 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con una secuencia correspondiente de aminoácidos de un polipéptido de u-PA tipo silvestre. Un polipéptido de u-PA de longitud completa modificado o una porción catalíticamente activa del mismo o un dominio proteasa del mismo de un polipéptido de u-PA modificado puede incluir polipéptidos que son proteínas de fusión siempre que la proteína de fusión posea la especificidad diana.

Como se usa en la presente, la numeración de quimotripsina se refiere a la numeración de aminoácidos de un polipéptido de quimotripsina madura de SEQ ID NO:76. La alineación de un dominio de proteasa de otra proteasa, tal como, por ejemplo, el dominio de proteasa de u-PA, se puede realizar con quimotripsina. En ese caso, los aminoácidos del polipéptido de u-PA que corresponden a aminoácidos de quimotripsina se les da la numeración de aminoácidos de quimotripsina. Las correspondientes posiciones se pueden determinar por esa alineación por un experto en la técnica usando alineaciones manuales o usando los numerosos programas de alineación disponibles (por ejemplo, BLASTP). Las correspondientes posiciones también se pueden basar en alineaciones estructurales, por ejemplo, mediante el uso de alineaciones simuladas por computadora de estructura de proteína. La mención de que los aminoácidos de un polipéptido corresponden a aminoácidos en una secuencia descrita se refiere a aminoácidos identificados tras la alineación del polipéptido con la secuencia descrita para maximizar la identidad u homología (donde se alinean los aminoácidos conservados) usando un algoritmo de alineación estándar, tal como el algoritmo GAP. Los números correspondientes de quimotripsina de las posiciones de aminoácido 159-411 del polipéptido de u-PA expuestos en SEQ ID NO:3 se proporcionan en la Tabla 1. Las posiciones de aminoácido con respecto a la secuencia expuesta en SEQ ID NO:3 están en letra normal, los residuos de aminoácidos en esas posiciones están en negritas y los correspondientes números de quimotripsina están en cursivas. Por ejemplo, tras la alineación del dominio de serina proteasa de u-PA (SEQ ID NO:2) con quimotripsina madura, la isoleucina (I) en la posición 159 en u-PA recibe la numeración de quimotripsina de I16. Por consiguiente, se numeran los aminoácidos subsiguientes. En un ejemplo, una fenilalanina (F) en la posición de aminoácido 173 de u-PA maduro (SEQ ID NO:3) corresponde a la posición de aminoácido F30 con base en la numeración de quimotripsina. Cuando un residuo existe en

una proteasa, pero no está presente en quimotripsina, al residuo de aminoácido se le da una notación de letra. Por ejemplo, los residuos en quimotripsina que son parte de un bucle con el aminoácido 60 con base en la numeración de quimotripsina, pero se insertan en la secuencia de u-PA en comparación con quimotripsina, se denominan, por ejemplo, D60a, Y60b o P60c. Estos residuos corresponden a D208, Y209 y P210, respectivamente, mediante numeración con respecto a la secuencia de u-PA madura expuesta en SEQ ID NO:3.

Tabla 1. Numeración de quimotripsina de u-PA

159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173
I	**I**	**G**	**G**	**E**	**F**	**T**	**T**	**I**	**E**	**N**	**Q**	**P**	**W**	**F**
16	*17*	*18*	*19*	*20*	*21*	*22*	*23*	*24*	*25*	*26*	*27*	*28*	*29*	*30*
174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188
A	**A**	**I**	**Y**	**R**	**R**	**H**	**R**	**G**	**G**	**S**	**V**	**T**	**Y**	**V**
31	*32*	*33*	*34*	*35*	*36*	*37*	*37 A*	*37 B*	*37C*	*37D*	*38*	*39*	*40*	*41*
189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203
C	**G**	**G**	**S**	**L**	**I**	**S**	**P**	**C**	**W**	**V**	**I**	**S**	**A**	**T**
42	*43*	*44*	*45*	*46*	*47*	*48*	*49*	*50*	*51*	*52*	*53*	*54*	*55*	*56*
204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218
H	**C**	**F**	**I**	**D**	**Y**	**P**	**K**	**K**	**E**	**D**	**Y**	**I**	**V**	**Y**
57	*58*	*59*	*60*	*60 A*	*60 B*	*60 C*	*61*	*62*	*62A*	*63*	*64*	*65*	*66*	*67*
219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233
L	**G**	**R**	**S**	**R**	**L**	**N**	**S**	**N**	**T**	**Q**	**G**	**E**	**M**	**K**
68	*69*	*70*	*71*	*72*	*73*	*74*	*75*	*76*	*77*	*78*	*79*	*80*	*81*	*82*
234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248
F	**E**	**V**	**E**	**N**	**L**	**I**	**L**	**H**	**K**	**D**	**Y**	**S**	**A**	**D**
83	*84*	*85*	*86*	*87*	*88*	*89*	*90*	*91*	*92*	*93*	*94*	*95*	*96*	*97*
249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263
T	**L**	**A**	**H**	**H**	**N**	**D**	**I**	**A**	**L**	**L**	**K**	**I**	**R**	**S**
97 A	*97 B*	*98*	*99*	*100*	*101*	*102*	*103*	*104*	*105*	*106*	*107*	*108*	*109*	*110*
264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278
K	**E**	**G**	**R**	**C**	**A**	**Q**	**P**	**S**	**R**	**T**	**I**	**Q**	**T**	**I**
110 A	*110 B*	*110 C*	*110 D*	*111*	*112*	*113*	*114*	*115*	*116*	*117*	*118*	*119*	*120*	*121*

279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293
C	**L**	**P**	**S**	**M**	**Y**	**N**	**D**	**P**	**Q**	**F**	**G**	**T**	**S**	**C**
122	*123*	*124*	*125*	*126*	*127*	*128*	*129*	*130*	*131*	*132*	*133*	*134*	*135*	*136*
294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308
E	**I**	**T**	**G**	**F**	**G**	**K**	**E**	**N**	**S**	**T**	**D**	**Y**	**L**	**Y**
137	*138*	*139*	*140*	*141*	*142*	*143*	*144*	*145*	*146*	*147*	*148*	*149*	*150*	*151*
309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323
P	**E**	**Q**	**L**	**K**	**M**	**T**	**V**	**V**	**K**	**L**	**I**	**S**	**H**	**R**
152	*153*	*154*	*155*	*156*	*157*	*158*	*159*	*160*	*161*	*162*	*163*	*164*	*165*	*166*
324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338
E	**C**	**Q**	**Q**	**P**	**H**	**Y**	**Y**	**G**	**S**	**E**	**V**	**T**	**T**	**K**
167	*168*	*169*	*170*	*170 A*	*170 B*	*171*	*172*	*173*	*174*	*175*	*176*	*177*	*178*	*179*
339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353
M	**L**	**C**	**A**	**A**	**D**	**P**	**Q**	**W**	**K**	**T**	**D**	**S**	**C**	**Q**
180	*181*	*182*	*183*	*184*	*185*	*185 A*	*185 B*	*186*	*187*	*188*	*189*	*190*	*191*	*192*
354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368
G	**D**	**S**	**G**	**G**	**P**	**L**	**V**	**C**	**S**	**L**	**Q**	**G**	**R**	**M**
193	*194*	*195*	*196*	*197*	*198*	*199*	*200*	*201*	*202*	*203*	*204*	*205*	*206*	*207*
369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383
T	**L**	**T**	**G**	**I**	**V**	**S**	**W**	**G**	**R**	**G**	**C**	**A**	**L**	**K**
208	*209*	*210*	*211*	*212*	*213*	*214*	*215*	*216*	*217*	*218*	*220*	*221*	*222*	*223*
384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398
D	**K**	**P**	**G**	**V**	**Y**	**T**	**R**	**V**	**S**	**H**	**F**	**L**	**P**	**W**
223 A	*224*	*225*	*226*	*227*	*228*	*229*	*230*	*231*	*232*	*233*	*234*	*235*	*236*	*237*
399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411		
I	**R**	**S**	**H**	**T**	**K**	**E**	**E**	**N**	**G**	**L**	**A**	**L**		
238	*239*	*240*	*241*	*242*	*243*	*244*	*245*	*246*	*247*	*248*	*249*	*250*		

Como se usa en la presente, k_{cat} mide la actividad catalítica de una enzima; las unidades de k_{cat} son segundos^{-1}. El recíproco de k_{cat} es el tiempo requerido por una molécula de enzima para “convertir" una molécula de sustrato; k_{cat} mide el número de moléculas de sustrato convertidas por la molécula de enzima por segundo. k_{cat} a veces se llama el número

de recambio. En enzimología, k_{cat} (también referido como número de recambio) es la cantidad máxima de conversiones químicas de moléculas de sustrato por segundo que un sitio catalítico individual ejecuta para una enzima dada. Es la velocidad máxima de reacción ($V_{máx}$) cuando todos los sitios catalíticos enzimáticos se saturan con sustrato.

Como se usa en la presente, la especificidad para un sustrato diana se refiere a una preferencia por la escisión de un sustrato diana por una proteasa en comparación con otro sustrato, al que se hace referencia como sustrato no diana. La especificidad se refleja en la constante de especificidad (k_{cat}/K_m), que es una medida de la afinidad de una proteasa por su sustrato y la eficiencia de la enzima. k_{cat}/K_m es una medida de la eficiencia de la enzima; un gran valor de k_{cat} (rotación rápida) o un pequeño valor de K_m (alta afinidad por el sustrato) hace que k_{cat}/K_m sea grande.

Como se usa en la presente, una constante de especificidad para la escisión es (k_{cat}/K_m), donde K_m es la constante de Michaelis-Menton ([S] a media $V_{máx}$) y k_{cat} es la $V_{máx}/[E_T]$, donde E_T es la concentración final de la enzima. Los parámetros k_{cat}, K_m y k_{cat}/K_m se pueden calcular graficando la inversa de la concentración de sustrato versus la inversa de la velocidad de escisión de sustrato, y ajustándose a la ecuación de Lineweaver-Burk ($1/velocidad=(K_m/V_{max})(1/[S]) + 1/V_{máx}$; donde $V_{máx}=[E_T]k_{cat}$). Se puede usar cualquier método para determinar la velocidad de aumento de escisión a lo largo del tiempo en la presencia de varias concentraciones de sustrato para calcular la constante de especificidad. Por ejemplo, un sustrato está enlazado a una porción fluorogénico, que se libera luego de la escisión por una proteasa. Al determinar la velocidad de escisión a diferentes concentraciones de enzima, se puede determinar k_{cat} para una proteasa particular. La constante de especificidad se puede utilizar para determinar la preferencia de una proteasa para un sustrato diana sobre otro sustrato.

Como se usa en la presente, la especificidad de sustrato se refiere a la preferencia de una proteasa para un sustrato diana sobre otro. La especificidad de sustrato se puede medir como una relación de constantes de especificidad.

Como se usa en la presente, una relación de especificidad de sustrato es la relación de constantes de especificidad y se puede usar para comparar especificidades de dos o más proteasas o una proteasa para dos o más sustratos. Por ejemplo, la especificidad de sustrato de una proteasa para sustratos competidores o de proteasas competidoras para un sustrato se puede comparar al comparar k_{cat}/K_m. Por ejemplo, una proteasa que tiene una constante de especificidad de 2×10^6 $M^{-1}seg^{-1}$ para un sustrato diana y 2×10^4 $M^{-1}seg^{-1}$ para un sustrato no diana es más específica para el sustrato diana. Usando las constantes de especificidad anteriores, la proteasa tiene una relación de especificidad de sustrato de 100

para el sustrato diana.

Como se usa en la presente, la preferencia o especificidad de sustrato para un sustrato diana se puede expresar como una relación de especificidad de sustrato. El valor particular de la relación que refleja una preferencia es una función de los sustratos y proteasas en cuestión. Una relación de especificidad de sustrato que es mayor que 1 significa una preferencia por un sustrato diana y una especificidad de sustrato menor que 1 significa una preferencia por un sustrato no diana. En general, una relación de al menos o aproximadamente 1 refleja una diferencia suficiente para que una proteasa se considere un producto terapéutico candidato.

Como se usa en la presente, especificidad alterada se refiere a un cambio en la especificidad de sustrato de una proteasa modificada en comparación con una proteasa tipo silvestre inicial. En general, el cambio en la especificidad es un reflejo del cambio en la preferencia de una proteasa modificada para un sustrato diana en comparación con un sustrato tipo silvestre de la proteasa (denominado en la presente, sustrato no diana). Habitualmente, las proteasas de u-PA modificadas proporcionadas en la presente exhiben una mayor especificidad de sustrato para la proteína C3 de complemento en comparación con la especificidad de sustrato de la proteasa de u-PA tipo silvestre. Por ejemplo, una proteasa modificada que tiene una relación de especificidad de sustrato de 100 para un sustrato diana versus un sustrato no diana exhibe una especificidad 10 veces mayor en comparación con una proteasa de andamiaje con una relación de especificidad de sustrato de 10. En otro ejemplo, una proteasa modificada que tiene una relación de especificidad de sustrato de 1 en comparación con una relación de 0.1, exhibe un aumento de 10 veces en la especificidad de sustrato. Para exhibir una mayor especificidad en comparación con una proteasa de andamiaje, una proteasa modificada tiene una especificidad de sustrato 1.5 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces o más mayor para cualquiera de más de las proteínas de complemento.

Como se usa en la presente, “selectividad” se puede usar indistintamente con especificidad cuando se refiere a la capacidad de una proteasa para elegir y escindir un sustrato diana entre una mezcla de sustratos competidores. La selectividad incrementada de una proteasa para un sustrato diana en comparación con cualquiera de uno o más sustratos diana diferentes se puede determinar, por ejemplo, al comparar las constantes de especificidad de escisión de los sustratos diana por una proteasa. Por ejemplo, si una proteasa tiene una constante de especificidad de escisión de 2×10^6 $M^{-1}seg^{-1}$ para un sustrato diana y 2×10^4 $M^{-1}seg^{-1}$ para cualquier otro de más sustratos, la proteasa es más selectiva para el sustrato diana.

Como se usa en la presente, una “actividad” o una "actividad funcional” de un polipéptido, tal como una proteasa, se refiere a cualquier actividad exhibida por el polipéptido. Estas actividades se pueden determinar empíricamente. Las actividades de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, capacidad para interactuar con una biomolécula, por ejemplo, a través de unión al sustrato, unión al ADN o dimerización, actividad de enzima, por ejemplo, actividad cinasa o actividad proteolítica. Para una proteasa (incluidos los fragmentos de proteasa), las actividades incluyen, pero no se limitan a, la capacidad de unirse específicamente a un sustrato particular, afinidad y/o especificidad de unión al sustrato (por ejemplo, afinidad y/ o especificidad alta o baja), funciones efectoras, tal como la capacidad de promover el sustrato (por ejemplo, proteína, es decir, C3) inhibición, neutralización, escisión o depuración, y actividades *in vivo*, tal como la capacidad de promover la escisión o depuración de proteínas. La actividad se puede valorar *in vitro* o *in vivo* usando ensayos reconocidos, tal como ELISA, citometría de flujo, resonancia de plasmones superficiales o ensayos equivalentes para medir la histología y microscopía de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, ensayos basados en células y ensayos de unión. Por ejemplo, para una proteasa, por ejemplo, una proteasa de u-PA modificada, las actividades se pueden evaluar midiendo la escisión de proteínas de sustrato, rotación, actividad residual, estabilidad y/o niveles *in vitro* y/o *in vivo*. Los resultados de estos ensayos *in vitro* que indican que un polipéptido exhibe una actividad se pueden correlacionar con la actividad del polipéptido *in vivo*, en el que la actividad *in vivo* se puede denominar actividad terapéutica o actividad biológica. La actividad de un polipéptido modificado puede ser cualquier nivel de porcentaje de actividad del polipéptido no modificado, incluyendo, pero no limitado a, en o aproximadamente 1% de la actividad, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más de actividad en comparación con el polipéptido no modificado. Los ensayos para determinar la funcionalidad o actividad de proteasas modificadas (o variantes) son bien conocidos en la técnica.

Las actividades funcionales incluyen, pero no se limitan a, actividad biológica, actividad catalítica o enzimática, antigenicidad (capacidad de unirse o competir con un polipéptido para unirse a un anticuerpo anti-polipéptido), inmunogenicidad, capacidad de formar multímeros y capacidad de unirse específicamente a un receptor o ligando para el polipéptido.

Como se usa en la presente, una actividad funcional con referencia a una proteína de complemento se refiere a una función mediada por complemento que incluye, pero no se limita a, anafilaxia, opsonización, quimiotaxis o lisis celular. Los ejemplos de ensayos para evaluar actividades de actividad de complemento incluyen hemólisis de glóbulos rojos y

detección de moléculas efectoras de complemento tal como por ELISA o SDS-PAGE.

Como se usa en la presente, actividad catalítica o actividad de escisión se refiere a la actividad de una proteasa como se evalúa en ensayos proteolíticos *in vitro* que detectan proteólisis de un sustrato seleccionado. La actividad de escisión se puede medir al evaluar la eficiencia catalítica de una proteasa.

Como se usa en la presente, la actividad hacia un sustrato diana se refiere a la actividad de escisión y/o actividad funcional, u otra medición que refleje la actividad de una proteasa sobre o hacia un sustrato diana. Una actividad funcional de un sustrato diana de proteína de complemento por una proteasa se puede medir evaluando una IC50 en un ensayo de complemento tal como lisis de células sanguíneas rojas u otros ensayos de este tipo conocidos por un experto en la técnica o proporcionados en la presente para evaluar la actividad del complemento. La actividad de escisión se puede medir al evaluar la eficiencia catalítica de una proteasa. Para propósitos en la presente, una actividad aumenta si una proteasa exhibe mayor proteólisis o escisión de un sustrato diana y/o modula (es decir, activa o inhibe) una actividad funcional de una proteína de complemento en comparación con la ausencia de la proteasa.

Como se usa en la presente, “mayor actividad” con referencia a un polipéptido de u-PA modificado significa que, cuando se prueba en las mismas condiciones, el polipéptido de u-PA modificado exhibe mayor actividad en comparación con un polipéptido de u-PA no modificado que no contiene los reemplazos de aminoácidos. Por ejemplo, un polipéptido de u-PA modificado exhibe al menos o aproximadamente al menos 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% o más de la actividad del polipéptido u-PA no modificado o de referencia.

Como se usa en la presente, el término “el mismo", cuando se usa en referencia a la afinidad de unión al anticuerpo, significa que la EC_{50}, constante de asociación (Ka) o constante de disociación (Kd) está dentro de aproximadamente 1 a 100 veces o 1 a 10 veces de la del anticuerpo de referencia (1-100 veces mayor afinidad o 1-100 veces menor afinidad, o cualquier valor numérico o intervalo o valor dentro de estos intervalos, que el anticuerpo de referencia).

Como se usa en la presente, "actividad de unión" se refiere a características de una molécula, por ejemplo, un polipéptido, relacionadas con si se une o no, y cómo, a uno o más compañeros de unión. Las actividades de unión incluyen la capacidad de unirse al compañero de unión, la afinidad con la que se une al compañero de unión (por ejemplo, alta afinidad), la fuerza del enlace con el compañero de unión y/o la especificidad para la unión con el compañero de unión.

Como se usa en la presente, EC_{50}, también llamada Kd aparente, es la concentración (por ejemplo, nM) de proteasa, donde el 50% de la actividad máxima se observa en una cantidad fija de sustrato (por ejemplo, la concentración de polipéptido de u-PA modificado necesario para escindirse a través del 50% de la hC3 disponible). Habitualmente, los valores de EC_{50} se determinan a partir de curvas de dosis-respuesta sigmoidales, donde la EC_{50} es la concentración en el punto de inflexión. Una alta afinidad de proteasa por su sustrato se correlaciona con un valor de EC_{50} bajo y una baja afinidad corresponde a un valor de EC_{50} alto. Las constantes de afinidad se pueden determinar mediante metodología cinética estándar para reacciones de proteasa, por ejemplo, inmunoensayos, tal como ELISA, seguido de análisis de ajuste de curva.

Como se usa en la presente, "constante de afinidad" se refiere a una constante de asociación (Ka) utilizada para medir la afinidad o fuerza de unión molecular entre una proteasa y un sustrato. Cuanto mayor sea la constante de afinidad, mayor será la afinidad de la proteasa por el sustrato. Las constantes de afinidad se expresan en unidades de molaridad recíproca (es decir., $M^{-1)}$ y se puede calcular a partir de la constante de velocidad para la reacción de asociación y disociación medida por la metodología cinética estándar para reacciones de sustrato de proteasa (por ejemplo, inmunoensayos, resonancia de plasmones superficiales u otros ensayos de interacción cinética conocidos en la técnica). La afinidad de unión de una proteasa también se puede expresar como una constante de disociación, o Kd. La constante de disociación es la recíproca de la constante de asociación, Kd = 1/Ka. Por lo tanto, una constante de afinidad también se puede representar por la Kd. Las constantes de afinidad se pueden determinar mediante metodología cinética estándar para reacciones de proteasa, por ejemplo, inmunoensayos, resonancia de plasmones superficiales (SPR) (Rich and Myszka (2000) *Curr. Opin. Biotechnol* 11:54; Englebienne (1998) *Analyst*. 123:1599), calorimetría de titulación isotérmica (ITC) u otros ensayos de interacción cinética conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Paul, ed., Fundamental Immunology, 2ª ed., Raven Press, Nueva York, páginas 332-336 (1989)). Los instrumentos y métodos para la detección y monitoreo en tiempo real de velocidades de unión se conocen y están comercialmente disponibles (*por* ejemplo, BIAcore 2000, BIAcore AB, Uppsala, Suecia y GE Healthcare Life Sciences; Malmqvist (2000) *Biochem*. *Soc. Trans*. 27:335).

Los métodos para calcular la afinidad son bien conocidos, tal como métodos para determinar valores de EC_{50} o métodos para determinar constantes de asociación/disociación, que incluyen aquellos ejemplificados en la presente. Por ejemplo, con respecto a EC_{50}, alta afinidad de unión significa que la proteasa se une específicamente a una proteína diana con una EC_{50} que es menor que aproximadamente 10 ng/mL, 9 ng/mL, 8 ng/mL, 7 ng/mL, 6 ng/mL,

5 ng/mL, 3 ng/mL, 2 ng/mL, 1 ng/mL o menos. La afinidad de unión alta también se puede caracterizar por una constante de disociación en equilibrio (Kd) de 10^{-6} M o menor, tal como 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M o 10^{-12} M o menor. En términos de constante de asociación de equilibrio (Ka), una alta afinidad de unión se asocia en general con valores de Ka mayores o iguales que aproximadamente 10^{6} M^{-1}, mayores o iguales que aproximadamente 10^{7} M^{-1}, mayores o iguales que aproximadamente 10^{8} M^{-1}, o mayores o iguales que aproximadamente 10^{9} M^{-1}, 10^{10} M^{-1}, 10^{11} M^{-1} o 10^{12} M^{-1}. La afinidad se puede estimar empíricamente o las afinidades se pueden determinar comparativamente, por ejemplo, al comparar la afinidad de dos o más anticuerpos para un antígeno particular, por ejemplo, al calcular relaciones parejas de las afinidades de los anticuerpos evaluados. Por ejemplo, estas afinidades se pueden determinar fácilmente usando técnicas convencionales, tal como mediante ELISA; diálisis de equilibrio; resonancia de plasmón superficial; mediante radioinmunoensayo usando antígeno diana radiomarcado; o mediante otro método conocido por el experto en la técnica. Los datos de afinidad se pueden analizar, por ejemplo, por el método de Scatchard *et al*., *Ann N.Y. Acad. Sci*., 51:660 (1949) o mediante análisis de ajuste de curva, por ejemplo, utilizando un modelo de regresión no lineal logístico de 4 parámetros utilizando la ecuación: y = ((A-D)/(1+((x/C)^B))) + D, donde A es la asíntota mínima, B es el factor de pendiente, C es el punto de inflexión (EC_{50}) y D es la asíntota máxima.

Como se usa en la presente, "ED_{50}" es la dosis (por ejemplo, mg/kg o nM) de una proteasa (por ejemplo, un u-PA modificado) que produce un resultado específico (por ejemplo, escisión de la proteína C3 de complemento) en el 50% de la población total (por ejemplo, cantidad total de C3 presente en la muestra).

Como se usa en la presente, el término "resonancia de plasmones superficiales" se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensor, por ejemplo, usando el sistema BIAcore (GE Healthcare Life Sciences).

Como se usa en la presente, una proteína humana es una codificada por una molécula de ácido nucleico, tal como ADN, presente en el genoma de un humano, incluidas todas las variantes alélicas y variaciones conservadoras de las mismas. Una variante o modificación de una proteína es una proteína humana si la modificación se basa en la secuencia prominente o tipo silvestre de una proteína humana.

Como se usa en la presente, los residuos de α-aminoácido de origen natural son los residuos de esos 20 α-aminoácidos que se encuentran en la naturaleza que se incorporan a la proteína mediante el reconocimiento específico de la molécula de ARNt cargada con su codón de ARNm cognado en humanos.

Como se usa en la presente, los aminoácidos que no se presentan de forma natural se refieren a aminoácidos que no se codifican genéticamente.

Como se usa en la presente, “ácido nucleico” se refiere a al menos dos nucleótidos enlazados o derivados de nucleótidos, incluyendo un ácido desoxirribonucleico (ADN) y un ácido ribonucleico (ARN) y análogos de los mismos, unidos conjuntamente, habitualmente mediante enlaces de fosfodiéster. También se incluyen en el término "ácido nucleico” análogos de ácidos nucleicos tal como ácido nucleico peptídico (PNA), ADN de fosforotioato y otros análogos y derivados o combinaciones de los mismos. Los ácidos nucleicos también incluyen derivados de ADN y ARN que contienen, por ejemplo, un análogo de nucleótido o un enlace "principal" que no sea un enlace de fosfodiéster, por ejemplo, un enlace de fosfotriéster, un enlace de fosforamidato, un enlace de fosforotioato, un enlace de tioéster o un enlace peptídico (ácido nucleico peptídico). El término también incluye, como equivalentes, derivados, variantes y análogos de ARN o ADN hechos de análogos de nucleótidos, ácidos nucleicos de hebra individual (sentido o antisentido) y doble hebra. Los desoxirribonucleótidos incluyen desoxiadenosina, desoxicitidina, desoxiguanosina y desoxitimidina. Para el ARN, la base de uracilo es uridina. Los ácidos nucleicos pueden ser de cadena individual o doble. Cuando se hace referencia a sondas o cebadores, que están opcionalmente marcados, tal como con una etiqueta detectable, tal como una etiqueta radiactiva o fluorescente, se contemplan moléculas de hebra individual. Estas moléculas son habitualmente de una longitud tal que su diana es estadísticamente única o de bajo número de copias (habitualmente menos de 5, en general menos de 3) para sondear o cebar una biblioteca. En general, una sonda o cebador contiene al menos 14, 16 o 30 nucleótidos contiguos de secuencia complementaria o idéntica a un gen de interés. Las sondas y cebadores pueden tener 10, 20, 30, 50, 100 o más nucleótidos de largo.

Como se usa en la presente, una "molécula de ácido nucleico aislada" es una que está separada de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural de la molécula de ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico "aislada", tal como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente libre de otro material celular o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente. Las moléculas de ácido nucleico aisladas de ejemplo proporcionadas en la presente incluyen moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican para una proteasa de u-PA proporcionada.

Como se usa en la presente, “sintética”, con referencia a, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico sintética o un gen sintético o un péptido sintético se refiere a una molécula de ácido nucleico o molécula de polipéptido que se produce por métodos

recombinantes y/o por métodos de síntesis química.

Como se usa en la presente, “polipéptido” se refiere a dos o más aminoácidos unidos covalentemente. Los términos “polipéptido” y “proteína” se usan indistintamente en la presente.

Como se usa en la presente, un “péptido” se refiere a un polipéptido que tiene una longitud de 2 a aproximadamente 40 aminoácidos.

Como se usa en la presente, los aminoácidos que se producen en las varias secuencias de aminoácidos proporcionadas en la presente se identifican de acuerdo con sus abreviaturas conocidas de tres letras o una letra (Tabla 2). Los nucleótidos que se producen en los varios fragmentos de ácido nucleico se designan con las designaciones de una sola letra estándar utilizadas rutinariamente en la técnica.

Como se usa en la presente, un “aminoácido” es un compuesto orgánico que contiene un grupo amino y un grupo de ácido carboxílico. Un polipéptido contiene dos o más aminoácidos. Para propósitos en la presente, los aminoácidos incluyen los veinte aminoácidos de origen natural (Tabla 2), aminoácidos no naturales y análogos de aminoácidos (es decir, aminoácidos donde el α-carbono tiene una cadena lateral). Como se usa en la presente, los aminoácidos, que se producen en las varias secuencias de aminoácidos de polipéptidos que aparecen en la presente, se identifican de acuerdo con sus abreviaturas conocidas de tres letras o una letra (ver Tabla 2). Los nucleótidos, que se producen en las varias moléculas y fragmentos de ácido nucleico, se designan con las designaciones estándar de una sola letra utilizadas rutinariamente en la técnica.

Como se usa en la presente, “residuo de aminoácido” se refiere a un aminoácido formado tras la digestión química (hidrólisis) de un polipéptido en sus enlaces peptídicos. Se presume que los residuos de aminoácidos descritos en la presente se encuentran en la forma isomérica “L”. Los residuos en la forma isomérica “D”, que se designan de esta manera, se pueden sustituir por cualquier residuo de L-aminoácido siempre que el polipéptido conserve la propiedad funcional deseada. NH_2 se refiere al grupo amino libre presente en el extremo amino de un polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxilo libre presente en el extremo carboxilo de un polipéptido. De acuerdo con la nomenclatura estándar de polipéptidos descrita en *J. Biol. Chem*., 243: 3557-3559 (1968) y adoptada en 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822, las abreviaturas de los residuos de aminoácidos se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2 – Tabla de correspondencia

SÍMBOLO		
1 Letras	**3 Letras**	**AMINOÁCIDO**
Y	Tyr	Tirosina
G	Gly	Glicina

SÍMBOLO		
1 Letras	**3 Letras**	**AMINOÁCIDO**
F	Phe	Fenilalanina
M	Met	Metionina
A	Ala	Alanina
S	Ser	Serina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
P	Pro	Prolina
K	Lys	Lisina
H	His	Histidina
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido glutámico
Z	Glx	Glu y/o Gln
W	Trp	Triptofano
R	Arg	Arginina
D	Asp	Ácido aspártico
N	Asn	Asparagina
B	Asx	Asn y/o Asp
C	Cys	Cisteina
X	Xaa	Desconocidos u otro

Todas las secuencias de residuos de aminoácidos representadas en la presente mediante una fórmula tienen una orientación de izquierda a derecha en la dirección convencional de extremo amino a extremo carboxilo. La frase "residuo de aminoácido" incluye los aminoácidos enumerados en la Tabla de Correspondencia (Tabla 2), aminoácidos modificados, no naturales e inusuales. Adicionalmente, un guion al comienzo o al final de una secuencia de residuos de aminoácidos indica un enlace peptídico a una secuencia adicional de uno o más residuos de aminoácidos o a un grupo de extremo amino tal como NH_2 o a un grupo de extremo carboxilo tal como COOH.

Como se usa en la presente, “aminoácidos de origen natural” se refieren a los 20 L-aminoácidos que se presentan en polipéptidos. Como se usa en la presente, los residuos de α-aminoácido de origen natural son los residuos de esos 20 α-aminoácidos que se encuentran en la naturaleza que se incorporan a la proteína mediante el reconocimiento específico de la molécula de ARNt cargada con su codón de ARNm cognado en humanos.

Como se usa en la presente, “aminoácido no natural” se refiere a un compuesto orgánico que tiene una estructura similar a un aminoácido natural pero se ha modificado estructuralmente para imitar la estructura y reactividad de un aminoácido natural. De esta manera, los aminoácidos de origen no natural incluyen, por ejemplo, aminoácidos o análogos de aminoácidos que no sean los 20 aminoácidos de origen natural e incluyen, pero no se

limitan a, los estereoisómeros D de aminoácidos. Los aminoácidos no naturales de ejemplo se conocen por los expertos en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, para-acetil-fenilalanina, para-azido-fenilalanina, ácido 2-Aminoadípico (Aad), el ácido 3-aminoadípico (bAad), la β-alanina/β-ácido amino-propiónico (Bala), el ácido 2-aminobutírico (Abu), el ácido 4-aminobutírico/piperidínico (4Abu), el ácido 6-amino-caproico (Acp), Ácido 2-Aminoheptanoico (Ahe), Ácido 2-Aminoisobutírico (Aib), Ácido 3-Aminoisobutírico (Baib), Ácido 2-Aminopimélico (Apm), Ácido 2,4-Diaminobutírico (Dbu), Desmosina (Des), ácido 2,2'-diaminopimélico (Dpm), ácido 2,3-diaminopropiónico (Dpr), N-etilglicina (EtGly), N-etilasparagina (EtAsn), hidroxilisina (Hyl), alo-hidroxilisina (Ahyl), 3-Hidroxiprolina (3Hyp), 4-Hidroxiprolina (4Hyp), Isodesmosina (Ide), alo-Isoleucina (Aile), N-Metilglicina, sarcosina (MeGly), N-Metilisoleucina (MeIle), 6-N-Metilisina (MeLys), N-Metilvalina (MeVal), Norvalina (Nva), Norleucina (Nle) y Ornitina (Orn). En la presente se describen aminoácidos no naturales de ejemplo que se conocen por los expertos en la materia.

Como se usa en la presente, una mezcla isocinética es aquella en la que las proporciones molares de aminoácidos se han ajustado en función de sus velocidades de reacción informadas (ver, *por* ejemplo, Ostresh *et al.* (1994) *Biopolymers* 34:1681).

Como se usa en la presente, una construcción de ADN es una molécula de ADN de cadena individual o doble, lineal o circular que contiene segmentos de ADN combinados y yuxtapuestos de una manera no encontrada en la naturaleza. Las construcciones de ADN existen como resultado de la manipulación humana e incluyen clones y otras copias de moléculas manipuladas.

Como se usa en la presente, un segmento de ADN es una porción de una molécula de ADN más grande que tiene atributos especificados. Por ejemplo, un segmento de ADN que codifica para un polipéptido específico es una porción de una molécula de ADN más larga, tal como un plásmido o fragmento de plásmido, que, cuando se lee desde la dirección 5'a 3', codifica para la secuencia de aminoácidos del polipéptido especificado.

Como se usa en la presente, el término ortólogo significa un polipéptido o proteína obtenida de una especie que es la contraparte funcional de un polipéptido o proteína de una especie diferente. Las diferencias de secuencia entre los ortólogos son el resultado de la especiación.

Como se usa en la presente, el término polinucleótido significa un polímero de hebra individual o doble de desoxirribonucleótidos o bases de ribonucleótido leídas desde el extremo 5' al extremo 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y se pueden aislar de fuentes naturales, sintetizar *in vitro* o preparar a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. La longitud de una molécula de polinucleótido se proporciona en la

presente en términos de nucleótidos (abreviado "nt") o pares de bases (abreviado “pb”). El término nucleótidos se usa para moléculas de hebra individual y doble donde el contexto lo permita. Cuando el término se aplica a moléculas de doble hebra, se usa para denotar la longitud total y se entiende que es equivalente al término pares de bases. Los expertos en la técnica entienden que las dos hebras de un polinucleótido de doble hebra pueden diferir ligeramente en longitud y que los extremos del mismo se pueden escalonar; por lo tanto, todos los nucleótidos dentro de una molécula de polinucleótido de doble hebra no se pueden emparejar. Estos extremos no apareados en general no exceden 20 nucleótidos de longitud.

Como se usa en la presente, la alineación de una secuencia se refiere al uso de homología para alinear dos o más secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Habitualmente, se alinean dos o más secuencias que se relacionan en un 50% o más de identidad. Un conjunto alineado de secuencias se refiere a 2 o más secuencias que están alineadas en posiciones correspondientes y pueden incluir secuencias de alineación derivadas de ARN, tal como EST y otros ADNc, alineadas con secuencias de ADN genómico. Los polipéptidos relacionados o variantes o moléculas de ácido nucleico se pueden alinear por cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Habitualmente estos métodos maximizan las coincidencias e incluyen métodos, tal como el uso de alineaciones manuales y al usar los numerosos programas de alineación disponibles (por ejemplo, BLASTP) y otros, conocidos por los expertos en la técnica. Al alinear las secuencias de polipéptidos o ácidos nucleicos, un experto en la técnica puede identificar porciones o posiciones análogas, usando residuos de aminoácidos idénticos y conservados como guías. Adicionalmente, un experto en la técnica también puede emplear residuos de aminoácidos o nucleótidos conservados como guías para encontrar residuos de aminoácidos o nucleótidos correspondientes entre secuencias humanas y no humanas. Las correspondientes posiciones también se pueden basar en alineaciones estructurales, por ejemplo, mediante el uso de alineaciones simuladas por computadora de estructura de proteína. En otros casos, se pueden identificar regiones correspondientes. Un experto en la técnica también puede emplear residuos de aminoácidos conservados como guías para encontrar residuos de aminoácidos correspondientes entre secuencias humanas y no humanas.

Como se usa en la presente, “identidad de secuencia” se refiere a la cantidad de aminoácidos o bases de nucleótidos idénticos o similares en una comparación entre una prueba y un polipéptido o polinucleótido de referencia. La identidad de secuencia se puede determinar mediante alineación de secuencia de las secuencias de ácido nucleico o proteína para identificar regiones de similitud o identidad. Para propósitos en la presente, la identidad de secuencia se determina en general mediante alineación para identificar residuos idénticos.

La alineación puede ser local o global. Las coincidencias, desajustes y separaciones se pueden identificar entre secuencias comparadas. Las separaciones son aminoácidos o nucleótidos nulos insertados entre los residuos de secuencias alineadas de modo que se alineen caracteres idénticos o similares. En general, puede haber separaciones internas y terminales. La identidad de secuencia se puede determinar teniendo en cuenta las separaciones como la cantidad de residuos/longitud idénticos de la secuencia más corta x 100. Cuando se utilizan penalizaciones de separación, la identidad de secuencia se puede determinar sin penalización por separaciones finales (por ejemplo, las separaciones terminales no se penalizan). De manera alternativa, la identidad de secuencia se puede determinar sin tener en cuenta separaciones como el número de posiciones/longitud idénticas de la secuencia alineada total x 100.

Como se usa en la presente, "en una posición correspondiente a" o la cita de que los nucleótidos o las posiciones de aminoácidos “corresponden a" nucleótidos o posiciones de aminoácidos en una secuencia descrita, tal como se expone en el listado de secuencias, se refiere a nucleótidos o posiciones de aminoácidos identificadas al alinearse con la secuencia descrita para maximizar la identidad usando un algoritmo de alineación estándar, tal como el algoritmo GAP. Para propósitos en la presente, la alineación de una secuencia de u-PA es a la secuencia de aminoácidos del dominio de proteasa de u-PA humano expuesta en SEQ ID NO: 2 o 5, particularmente un u-PA humano de referencia de SEQ ID NO:5. Al alinear las secuencias, un experto en la técnica puede identificar residuos correspondientes, por ejemplo, usando residuos de aminoácidos conservados e idénticos como guías. En general, para identificar las posiciones correspondientes, las secuencias de aminoácidos se alinean de manera que se obtiene la coincidencia de orden más alto (ver, por ejemplo: *Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; y Carillo *et al.* (1988) *SIAM J Applied Math* 48:1073). De manera alternativa, el experto en la técnica puede numerar los residuos mediante el número de quimotripsina, identificando de esta manera los residuos correspondientes. Para secuencias estrechamente relacionadas, no se necesita un algoritmo informático; la alineación se puede hacer visualmente.

Como se usa en la presente, una “alineación global” es una alineación que alinea dos secuencias de principio a fin, alineando cada letra en cada secuencia solo una vez. Se

produce una alineación, independientemente de si existe similitud o identidad entre las secuencias. Por ejemplo, 50% de identidad de secuencia basada en “alineación global” significa que en una alineación de la secuencia completa de dos secuencias comparadas cada una de 100 nucleótidos de longitud, 50% de los residuos son los mismos. Se entiende que la alineación global también se puede usar para determinar la identidad de secuencia incluso cuando la longitud de las secuencias alineadas no es la misma. Las diferencias en los extremos terminales de las secuencias se tienen en cuenta para determinar la identidad de secuencia, a menos que se seleccione “sin penalización por separaciones terminales”. En general, una alineación global se usa en secuencias que comparten una similitud significativa en la mayor parte de su longitud. Los algoritmos de ejemplo para realizar la alineación global incluyen el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman *et al.* (1970) *J. Mol. Biol*. 48: 443). Los programas de ejemplo para realizar la alineación global están disponibles públicamente e incluyen la Herramienta de alineación de secuencia global disponible en el sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (ncbi.nlm.nih.gov/), y el programa disponible en deepc2.psi.iastate.edu/aat/align/align.html.

Como se usa en la presente, una “alineación local” es una alineación que alinea dos secuencias, pero solo alinea aquellas partes de las secuencias que comparten similitud o identidad. Por lo tanto, una alineación local determina si los subsegmentos de una secuencia están presentes en otra secuencia. Si no hay similitud, no se devuelve ninguna alineación. Los algoritmos de alineación local incluyen algoritmo BLAST y Smith-Waterman (*Adv*. *Appl. Math*. 2: 482 (1981)). Por ejemplo, 50% de identidad de secuencia basada en “alineación local” significa que en una alineación de la secuencia completa de dos secuencias comparadas de cualquier longitud, una región de similitud o identidad de 100 nucleótidos de longitud tiene 50% de los residuos que son iguales en la región de similitud o identidad.

Para propósitos en la presente, la identidad de secuencia se puede determinar por programas de algoritmo de alineación estándar utilizados con penalizaciones por separación predeterminadas establecidas por cada proveedor. Los parámetros predeterminados para el programa GAP pueden incluir: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para no identidades) y la matriz de comparación ponderada de Gribskov *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res*. 14: 6745, como lo describen Schwartz y Dayhoff, eds., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979); (2) una penalización de 3.0 por cada separación y una penalización adicional de 0.10 por cada símbolo en cada separación; y (3) ninguna penalización por separaciones finales. Si cualesquiera de dos moléculas de ácido nucleico tienen secuencias de nucleótidos o cualesquiera de dos polipéptidos tienen secuencias de aminoácidos que son al menos 80%,

85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% "idénticas", u otras variaciones similares que citan un por ciento de identidad, se pueden determinar usando algoritmos informáticos conocidos con base en alineación local o global (ver, por ejemplo, wikipedia.org/wiki/Sequence_alignment_software, proporcionando enlaces a docenas de bases de datos y programas de alineación conocidos y disponibles públicamente). En general, para propósitos en la presente, la identidad de secuencia se determina usando algoritmos de cómputo con base en la alineación global, tal como la herramienta de alineación global de secuencias Needleman-Wunsch disponible de NCBI/BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&Page_TYPE=BlastHome); LAlign (William Pearson que implementa el algoritmo Huang y Miller (*Adv*. *Appl. Math*. (1991) 12:337-357)); y el programa de Xiaoqui Huang disponible en deepc2.psi.iastate.edu/aat/align/align.html. En general, al comparar secuencias de nucleótidos en la presente, se utiliza una alineación con penalización por separaciones finales. La alineación local también se puede usar cuando las secuencias que se comparan son sustancialmente de la misma longitud.

Como se usa en la presente, el término "identidad" representa una comparación o alineación entre una prueba y un polipéptido o polinucleótido de referencia. En un ejemplo no limitante, “al menos 90% idéntico a” se refiere a por ciento de identidades de 90% a 100% con respecto al polipéptido o polinucleótido de referencia. La identidad a un nivel de 90% o más es indicativa del hecho que, suponiendo que para propósitos de ejemplificación se compare una longitud de polipéptido o polinucleótido de prueba y referencia de 100 aminoácidos o nucleótidos, no se difiere más del 10% (es decir, 10 de entre 100) de aminoácidos o nucleótidos en el polipéptido o polinucleótido de prueba de aquel de los polipéptidos de referencia. Se pueden hacer comparaciones similares entre un polinucleótido de prueba y de referencia. Estas diferencias se pueden representar como mutaciones puntuales distribuidas aleatoriamente en toda la longitud de una secuencia de aminoácidos o se pueden agrupar en una o más ubicaciones de longitud variable hasta el máximo permitido, por ejemplo, 10/100 diferencia de aminoácidos (aproximadamente 90% de identidad). Las diferencias también pueden deberse a deleciones o truncamientos de residuos de aminoácido. Las diferencias se definen como sustituciones, inserciones o deleciones de ácido nucleico o aminoácido. Dependiendo de la longitud de las secuencias comparadas, al nivel de homologías o identidades por encima de aproximadamente 85-90%, el resultado puede ser independiente del programa y el conjunto de parámetros de separación; estos altos niveles de identidad se pueden evaluar fácilmente, frecuentemente sin depender del software.

Como se usa en la presente, un enlace de disulfuro (también llamado un enlace S-S o un puente de disulfuro) es un enlace covalente simple derivado del acoplamiento de

grupos tiol. Los enlaces de disulfuro en proteínas se forman entre los grupos tiol de residuos de cisteína y estabilizan las interacciones entre dominios polipeptídicos.

Como se usa en la presente, “acoplado” o “conjugado” significa unido a través de una interacción covalente o no covalente. Los conjugados proporcionados en la presente contienen un dominio de proteasa de polipéptido de u-PA modificado (al que se hace referencia como un "SPD", ver, por ejemplo, Figura 4), y todo o parte del polipéptido de u-PA restante, unido directamente o mediante un ligador a otra porción, tal como un polipéptido que confiere una propiedad, tal como mayor semivida sérica (es decir, HSA de albúmina sérica humana), o facilita la expresión o purificación (es decir, SUMO, his-SUMO, TSG-6), o dirige la proteína al receptor, tal como un anticuerpo que se une a un receptor. El polipéptido se puede enlazar directamente o mediante un ligador polipeptídico, en general pocos aminoácidos, aproximadamente 4-20, tal como combinaciones de residuos Ser y Gly. Los conjugados que contienen un polipéptido en general son proteínas de fusión. Los conjugados también incluyen polipéptidos de u-PA modificados en los que los residuos de aminoácido están unidos a porciones, tal como porciones de PEG, porciones de glicosilación y otras porciones similares.

Como se usa en la presente, “cebador" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede actuar como un punto de inicio de síntesis de ADN dirigida por plantilla bajo condiciones apropiadas (por ejemplo, en presencia de cuatro nucleósido-trifosfatos diferentes y un agente de polimerización, tal como ADN-polimerasa, ARN-polimerasa o transcriptasa inversa) en un amortiguador adecuado y a una temperatura adecuada. El experto en la técnica entiende que ciertas moléculas de ácido nucleico pueden servir como una "sonda” y como un “cebador”. Sin embargo, un cebador tiene un grupo 3’ hidroxilo para la extensión. Se puede usar un cebador en una variedad de métodos, que incluyen, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR de transcriptasa inversa (RT), PCR de ARN, LCR, PCR multiplexada, PCR de franja estrecha, PCR de captura, PCR de expresión, RACE 3' y 5', PCR *in situ*, PCR mediada por ligadura y otros protocolos de amplificación.

Como se usa en la presente, “cebador” se refiere a un oligonucleótido que contiene dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, habitualmente más de tres, a partir de los cuales se puede iniciar la síntesis de un producto de extensión de cebador. Las condiciones experimentales que conducen a la síntesis incluyen la presencia de nucleósido-trifosfatos y un agente para la polimerización y extensión, tal como ADN-polimerasa, y un amortiguador, temperatura y pH adecuados.

Como se usa en la presente, “par de cebadores” se refiere a un conjunto de cebadores que incluye un cebador 5' (en dirección 5’) que se hibrida con el extremo 5' de una secuencia a amplificar (por ejemplo, mediante PCR) y un cebador 3' (en dirección 3’) que se

hibrida con el complemento del extremo 3' de la secuencia que se va a amplificar.

Como se usa en la presente, "se hibrida específicamente" se refiere a fijación, mediante apareamiento de bases complementarias, de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido) con una molécula de ácido nucleico diana. Los expertos en la técnica están familiarizados con parámetros *in vitro* e *in vivo* que afectan la hibridación específica, tal como la longitud y composición de la molécula particular. Los parámetros particularmente pertinentes para la hibridación *in vitro* incluyen además temperatura de fijación y lavado, composición amortiguadora y concentración de sal. Las condiciones de lavado de ejemplo para eliminar moléculas de ácido nucleico no unidas específicamente a alta severidad son 0.1 x SSPE, 0.1% SDS, 65 °C y a severidad media son 0.2 x SSPE, 0.1% SDS, 50 °C. Las condiciones de severidad equivalentes se conocen en la técnica. El experto en la técnica puede ajustar fácilmente estos parámetros para lograr la hibridación específica de una molécula de ácido nucleico con una molécula de ácido nucleico diana adecuada para una aplicación particular.

Como se usa en la presente, sustancialmente idéntico a un producto significa lo suficientemente similar como para que la propiedad de interés no cambie lo suficiente como para que el producto sustancialmente idéntico se pueda usar en lugar del producto.

Como se usa en la presente, también se entiende que los términos “sustancialmente idéntico” o “similar” varían con el contexto como lo entienden los expertos en la técnica pertinente.

Como se usa en la presente, la forma tipo silvestre de un polipéptido o molécula de ácido nucleico es una forma codificada por un gen o por una secuencia codificante codificada por el gen. Habitualmente, una forma tipo silvestre de un gen, o molécula codificada por el mismo, no contiene mutaciones u otras modificaciones que alteren la función o estructura. El término tipo silvestre también abarca formas con variación alélica tal como se produce entre dos o más especies. Como se usa en la presente, una forma predominante de un polipéptido o molécula de ácido nucleico se refiere a una forma de la molécula que es la forma principal producida a partir de un gen. Una “forma predominante” varía de fuente a fuente. Por ejemplo, diferentes tipos de células o tejidos pueden producir diferentes formas de polipéptido, por ejemplo, mediante empalme alternativo y/o procesamiento alternativo de proteínas. En cada tipo de célula o tejido, un polipéptido diferente puede ser una “forma predominante”.

Como se usa en la presente, una variante alélica o variación alélica hace referencia a cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alérgica surge naturalmente a través de la mutación y puede dar

como resultado polimorfismo fenotípico dentro de las poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser imperceptibles (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar para polipéptidos que tienen secuencia alterada de aminoácidos. El término “variante alélica” también se usa en la presente para denotar una proteína codificada por una variante alélica de un gen. Habitualmente, la forma de referencia del gen codifica para una forma tipo silvestre y/o forma predominante de un polipéptido de una población o miembro de referencia individual de una especie. Habitualmente, las variantes alélicas, que incluyen variantes entre dos o más especies, tienen al menos 80%, 90% o más de identidad de aminoácidos con una forma silvestre y/o predominante de la misma especie; el grado de identidad depende del gen y si la comparación es entre especies o intraespecies. En general, las variantes alélicas intraespecies tienen al menos o al menos aproximadamente 80%, 85%, 90% o 95% de identidad o más con un tipo salvaje y/o forma predominante, incluyendo al menos o al menos aproximadamente 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad con una forma tipo silvestre y/o predominante de un polipéptido.

Como se usa en la presente, “alelo", que se usa indistintamente en la presente con “variante alélica” se refiere a formas alternativas de un gen o partes del mismo. Los alelos ocupan el mismo locus o posición en cromosomas homólogos. Cuando un sujeto tiene dos alelos idénticos de un gen, se dice que el sujeto es homocigoto para ese gen o alelo. Cuando un sujeto tiene dos alelos diferentes de un gen, se dice que el sujeto es heterocigoto para el gen. Los alelos de un gen específico pueden diferir entre sí en un solo nucleótido o varios nucleótidos, y pueden incluir sustituciones, eliminaciones e inserciones de nucleótidos. Un alelo de un gen también puede ser una forma de un gen que contiene una mutación.

Como se usa en la presente, las variantes de especies se refieren a variantes en polipéptidos entre diferentes especies, incluidas diferentes especies de mamíferos, tal como ratón y humano. En general, las variantes de especies tienen aproximadamente o 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o más de identidad de secuencia. Los residuos correspondientes entre dos o más variantes de especies se pueden determinar mediante la comparación y alineación de secuencias para maximizar la cantidad de nucleótidos o residuos coincidentes, por ejemplo, de modo que la identidad entre las secuencias sea igual o mayor que 95%, igual o mayor que 96%, igual o mayor que 97%, igual o mayor que 98% o mayor que 99%. La posición de interés se da entonces el número asignado en la molécula de ácido nucleico de referencia. La alineación se puede realizar manualmente o a simple vista, particularmente, cuando la identidad de secuencia es mayor que 80%.

Como se usa en la presente, una variante de empalme se refiere a una variante producida por procesamiento diferencial de una transcripción primaria de ADN genómico que

da como resultado más de un tipo de ARNm.

Como se usa en la presente, la modificación con referencia a la modificación de la secuencia primaria de aminoácidos de un polipéptido o una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico e incluye deleciones, inserciones y reemplazos de aminoácidos y nucleótidos, respectivamente. Esto en contraste con las modificaciones del polipéptido en sí, que incluyen modificaciones postraduccionales, tal como glicosilación, farnisilación, pegilación y fusiones, tal como fusiones con otros polipéptidos para cambiar una propiedad, tal como semivida sérica, tal como mediante albuminación, fusión con albúmina, tal como albúmina sérica humana, y otras modificaciones de este tipo al polipéptido. De esta manera, la referencia a modificaciones de la secuencia de aminoácidos se refiere a inserciones, deleciones, sustituciones/reemplazos y combinaciones de los mismos. La modificación del polipéptido se refiere a modificaciones que se agregan al polipéptido que no cambian la secuencia del mismo.

Para propósitos en la presente, se pueden realizar sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos en cualquiera de los polipéptidos de u-PA o fragmentos catalíticamente activos de los mismos siempre que la proteína resultante exhiba actividad de proteasa u otra actividad (o, si se desea, estos cambios se pueden realizar para eliminar la actividad). Se pueden hacer modificaciones al hacer sustituciones conservadoras de aminoácidos y también sustituciones no conservadoras de aminoácidos. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos que alteran deseable o ventajosamente las propiedades de las proteínas. En una modalidad, se pueden realizar mutaciones que evitan la degradación del polipéptido. Muchas proteasas se escinden después de residuos básicos, tal como R y K; para eliminar esa escisión, el residuo básico se reemplaza con un residuo no básico. La interacción de la proteasa con un inhibidor se puede bloquear mientras se retiene la actividad catalítica al efectuar un cambio no conservador en el sitio de interacción del inhibidor con la proteasa. Se pueden alterar también otras actividades. Por ejemplo, la unión al receptor se puede alterar sin alterar la actividad catalítica.

Las sustituciones de aminoácidos contempladas incluyen sustituciones conservadoras, tal como aquellas expuestas en la Tabla 3, que no eliminan la actividad proteolítica. Como se describe en la presente, también se contemplan sustituciones que alteran las propiedades de las proteínas, tal como la eliminación de sitios de escisión y otros sitios similares; estas sustituciones en general no son conservadoras, pero pueden ser realizadas fácilmente por los expertos en la técnica.

Como se usa en la presente, las sustituciones conservadoras adecuadas de aminoácidos son conocidas por los expertos en esta técnica y se pueden realizar en general

sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en la técnica reconocen que, en general, las sustituciones de aminoácidos individuales en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (ver, *por* ejemplo, Watson *et al*. Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p.224). Estas sustituciones se pueden realizar de acuerdo con las expuestas en la Tabla 3 de la siguiente manera:

Tabla 3

Residuo original	Sustitución conservadora de ejemplo
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys
Asn (N)	Gln; His
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala; Pro
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; Gln; Glu
Met (M)	Leu; Tyr; Ile
Phe (F)	Met; Leu; Tyr
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

Otras sustituciones también son permisibles y se pueden determinar empíricamente o de acuerdo con sustituciones conservadoras conocidas.

Como se usa en la presente, el término promotor significa una porción de un gen que contiene secuencias de ADN que proporcionan la unión de ARN-polimerasa e inicio de la transcripción. Las secuencias promotoras se encuentran comúnmente, pero no siempre, en la región 5’ no codificante de genes.

Como se usa en la presente, el polipéptido o proteína aislada o purificada o porción biológicamente activa de la misma está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula de tejido de la cual se deriva la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetizan químicamente. Se puede determinar que los preparados están sustancialmente libres si aparecen libres de impurezas fácilmente detectables como se determina por métodos estándar de análisis, tal como cromatografía en capa fina (TLC), electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), usados por los expertos en la técnica para

evaluar esa pureza, o lo suficientemente puros como para que una purificación adicional no altere detectablemente las propiedades físicas y químicas, tal como actividades enzimáticas y biológicas, de la sustancia. Los expertos en la técnica conocen métodos para la purificación de los compuestos para producir compuestos sustancialmente puros químicamente. Sin embargo, un compuesto sustancialmente puro químicamente puede ser una mezcla de estereoisómeros. En estos casos, la purificación adicional puede aumentar la actividad específica del compuesto.

El término sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas en las que la proteína se separa de los componentes celulares de las células a partir de las cuales se aísla o se produce de forma recombinante. En una modalidad, el término sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas proteasas que tienen menos de aproximadamente 30% (en peso seco) de proteínas no de proteasa (a las que también se hace referencia en la presente como una proteína contaminante), en general menos de aproximadamente 20% de proteínas no de proteasa o 10% de proteínas no de proteasa o menos de aproximadamente 5% de proteínas no de proteasa. Cuando la proteína de proteasa o porción activa de la misma se produce de forma recombinante, también está sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de, aproximadamente o igual a 20%, 10% o 5% del volumen de la preparación de proteína de proteasa.

Como se usa en la presente, el término sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos incluye preparaciones de proteínas de proteasa en las que la proteína está separada de precursores químicos u otros productos químicos que están involucrados en la síntesis de la proteína. El término incluye preparaciones de proteínas de proteasa que tienen menos de aproximadamente 30% (en peso seco), 20%, 10%, 5% o menos de precursores químicos o productos químicos o componentes no proteicos.

Como se usa en la presente, la producción por medios recombinantes mediante el uso de métodos de ADN recombinante se refiere al uso de métodos bien conocidos de biología molecular para expresar proteínas codificadas por ADN clonado.

Como se usa en la presente, “expresión” se refiere al proceso por el cual se producen polipéptidos mediante transcripción y traducción de polinucleótidos. El nivel de expresión de un polipéptido se puede evaluar usando cualquier método conocido en la técnica, incluidos, por ejemplo, métodos para determinar la cantidad del polipéptido producido a partir de la célula hospedadora. Estos métodos pueden incluir, pero no se limitan a, cuantificación del polipéptido en el lisado celular mediante ELISA, tinción con azul de Coomassie después de electroforesis en gel, ensayo de proteína Lowry y ensayo de proteína

Bradford.

Como se usa en la presente, una “célula hospedadora” es una célula que se usa para recibir, mantener, reproducir y/o amplificar un vector. Las células hospedadoras también se pueden utilizar para expresar el polipéptido codificado por el vector. El ácido nucleico contenido en el vector se replica cuando la célula hospedadora se divide, amplificando así los ácidos nucleicos.

Como se usa en la presente, un “vector” o "plásmido" es un ácido nucleico replicable a partir del cual se pueden expresar una o más proteínas heterólogas cuando el vector se transforma en una célula hospedadora adecuada. La referencia a un vector incluye elementos discretos que se usan para introducir ácido nucleico heterólogo en células para su expresión o replicación de las mismas. La referencia a un vector también incluye aquellos vectores en los que se puede introducir un ácido nucleico que codifica para un polipéptido o fragmento del mismo, habitualmente mediante digestión por restricción y ligadura. La referencia a un vector también incluye aquellos vectores que contienen ácido nucleico que codifica para una proteasa, tal como un u-PA modificado. El vector se usa para introducir el ácido nucleico que codifica para el polipéptido en la célula hospedadora para la amplificación del ácido nucleico o para la expresión/visualización del polipéptido codificado por el ácido nucleico. Los vectores habitualmente permanecen episómicos, pero se pueden diseñar para efectuar la integración de un gen o parte del mismo en un cromosoma del genoma. También se contemplan vectores que son cromosomas artificiales, tal como cromosomas artificiales de levadura y cromosomas artificiales de mamíferos. La selección y uso de estos vehículos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Un vector también incluye “vectores de virus” o “vectores virales”. Los vectores virales son virus modificados que están unidos operativamente a genes exógenos para transferir (como vehículos o transportadores) los genes exógenos a las células.

Como se usa en la presente, un “vector de expresión” incluye vectores capaces de expresar ADN que está unido operativamente con secuencias reguladoras, tal como regiones promotoras, que son capaces de efectuar la expresión de estos fragmentos de ADN. Estos segmentos adicionales pueden incluir secuencias promotoras y terminadoras y, opcionalmente, pueden incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un intensificador, una señal de poliadenilación y similares. Los vectores de expresión en general se derivan de ADN de plásmido o viral, o pueden contener elementos de ambos. De esta manera, un vector de expresión se refiere a una construcción de ADN o ARN recombinante, tal como un plásmido, un fago, virus recombinante u otro vector que, tras la introducción en una célula hospedadora adecuada, da como resultado la expresión del ADN

clonado. Los vectores de expresión apropiados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen aquellos que son replicables en células eucariotas y/o células procariotas y aquellos que permanecen episómicos o aquellos que se integran en el genoma de la célula hospedadora.

Como se usa en la presente, el vector también incluye “vectores de virus” o “vectores virales”. Los vectores virales son virus modificados que están unidos operativamente a genes exógenos para transferir (como vehículos o transportadores) los genes exógenos a las células.

Como se usa en la presente, un adenovirus se refiere a cualquiera de un grupo de virus que contienen ADN que provocan conjuntivitis e infecciones del tracto respiratorio superior en humanos. Como se usa en la presente, ADN desnudo se refiere a ADN libre de histona que se puede usar para vacunas y terapia génica. El ADN desnudo es el material genético que se pasa de célula a célula durante una transferencia de genes procesada llamada transformación. En la transformación, el ADN purificado o desnudo es absorbido por la célula receptora que le dará a la célula receptora una nueva característica o fenotipo.

Como se usa en la presente, “unido operativamente” con referencia a secuencias, regiones, elementos o dominios de ácido nucleico significa que las regiones de ácido nucleico están funcionalmente relacionadas entre sí. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica para un péptido guía puede estar unido operativamente al ácido nucleico que codifica para un polipéptido, por lo que los ácidos nucleicos se pueden transcribir y traducir para expresar una proteína de fusión funcional, donde el péptido guía efectúa la secreción del polipéptido de fusión. En algunos casos, el ácido nucleico que codifica para un primer polipéptido (por ejemplo, un péptido guía) está unido operativamente al ácido nucleico que codifica para un segundo polipéptido y los ácidos nucleicos se transcriben como un transcripto individual de ARNm, pero la traducción del transcripto de ARNm puede dar como resultado que se exprese uno de dos polipéptidos. Por ejemplo, un codón de detención ámbar puede estar ubicado entre el ácido nucleico que codifica para el primer polipéptido y el ácido nucleico que codifica para el segundo polipéptido, de modo que, cuando se introduce en una célula supresora ámbar parcial, el transcrito de ARNm individual resultante se puede traducir para producir una proteína de fusión que contiene el primer y segundo polipéptido, o puede traducirse para producir solo el primer polipéptido. En otro ejemplo, un promotor puede estar unido operativamente a ácido nucleico que codifica para un polipéptido, mediante el cual el promotor regula o media la transcripción del ácido nucleico.

Como se usa en la presente, “secuencia primaria” se refiere a la secuencia de residuos de aminoácido en un polipéptido o la secuencia de nucleótidos en una molécula de

ácido nucleico.

Como se usa en la presente, la secuencia de unión a proteína se refiere a una secuencia de proteína o péptido que es capaz de unirse específicamente a otras secuencias de proteína o péptido en general, a un conjunto de secuencias de proteína o péptido o a una secuencia de proteína o péptido particular.

Como se usa en la presente, una “etiqueta” o una “etiqueta de epítopo” se refiere a una secuencia de aminoácidos, habitualmente agregados al extremo C-terminal o N-terminal de un polipéptido, tal como un u-PA proporcionado en la presente. La inclusión de etiquetas fusionadas a un polipéptido puede facilitar la purificación y/o detección de polipéptidos. Habitualmente, una etiqueta o polipéptido de etiqueta se refiere a un polipéptido que tiene suficientes residuos para proporcionar un epítopo reconocido por un anticuerpo o puede servir para la detección o purificación, pero es lo suficientemente corto como para que no interfiera con la actividad del polipéptido al que está unido. El polipéptido de etiqueta habitualmente es lo suficientemente único como para que un anticuerpo que se une específicamente al mismo no reaccione sustancialmente de forma cruzada con epítopos en el polipéptido al que está unido. Las proteínas etiquetadas con epítopo se pueden purificar por afinidad usando anticuerpos altamente específicos formulados contra las etiquetas.

Los polipéptidos de etiqueta adecuados en general tienen al menos 5 o 6 residuos de aminoácidos y usualmente entre aproximadamente 8-50 residuos de aminoácidos, habitualmente entre 9-30 residuos. Las etiquetas pueden estar unidas a una o más proteínas y permiten la detección de la proteína o su recuperación a partir de una muestra o mezcla. Estas etiquetas son bien conocidas y se pueden sintetizar y diseñar fácilmente. Los polipéptidos de etiqueta de ejemplo incluyen aquellos utilizados para la purificación de afinidad e incluyen etiquetas de Modificador Tipo Ubiquitina Pequeña (SUMO), etiquetas FLAG, etiquetas His, el polipéptido de etiqueta de hemaglutinina (HA) de influenza y su anticuerpo 12CA5, (Field *et al*. (1988) *Mol. Cell. Biol*. 8:2159-2165); la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 para los mismos (ver, por ejemplo, Evan *et al*. (1985) *Molecular and Cellular Biology* 5:3610-3616); y la etiqueta de glicoproteína D (gD) del virus del herpes simple y su anticuerpo (Paborsky *et al*. (1990) *Protein Engineering* 3:547-553). Un anticuerpo utilizado para detectar un anticuerpo marcado con epítopo se denomina habitualmente en la presente anticuerpo secundario.

Como se usa en la presente, la secuencia de unión a metal se refiere a una secuencia de proteína o péptido que es capaz de unirse específicamente a iones metálicos en general, a un conjunto de iones metálicos o a un ion metálico particular.

Como se usa en la presente, el término evaluación pretende incluir la

determinación cuantitativa y cualitativa en el sentido de obtener un valor absoluto para la actividad de una proteasa, o un dominio de la misma, presente en la muestra, y también de obtener un índice, relación, porcentaje, valor visual u otro valor indicativo del nivel de la actividad. La evaluación puede ser directa o indirecta y las especies químicas realmente detectadas no necesitan ser, por supuesto, el producto de proteólisis en sí, pero pueden, por ejemplo, ser un derivado del mismo o alguna sustancia adicional. Por ejemplo, detección de un producto de escisión de una proteína del complemento, tal como mediante SDS-PAGE y tinción de proteínas con azul de Coomassie.

Como se usa en la presente, actividad biológica se refiere a las actividades *in vivo* de un compuesto o respuestas fisiológicas que resultan de la administración *in vivo* de un compuesto, composición u otra mezcla. La actividad biológica, por lo tanto, abarca los efectos terapéuticos y actividad farmacéutica de estos compuestos, composiciones y mezclas. Se pueden observar actividades biológicas en sistemas *in vitro* diseñados para probar o utilizar estas actividades. De esta manera, para fines de la presente, una actividad biológica de una proteasa es su actividad catalítica en la cual se hidroliza un polipéptido.

Como se usa en la presente, equivalente, cuando se refiere a dos secuencias de ácidos nucleicos, significa que las dos secuencias en cuestión codifican la misma secuencia de aminoácidos o proteínas equivalentes. Cuando se usa equivalente en referencia a dos proteínas o péptidos, significa que las dos proteínas o péptidos tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos con solo sustituciones de aminoácidos (tal como, pero no se limita a, cambios conservadores tal como los establecidos en la Tabla 3, anterior) que no alteran sustancialmente la actividad o función de la proteína o péptido. Cuando equivalente se refiere a una propiedad, la propiedad no necesita estar presente en la misma medida (por ejemplo, dos péptidos pueden exhibir velocidades diferentes del mismo tipo de actividad de enzima), pero las actividades usualmente son sustancialmente iguales. Complementario, cuando se refiere a dos secuencias de nucleótidos, significa que las dos secuencias de nucleótidos son capaces de hibridarse, habitualmente con menos de 25%, 15% o 5% de desajustes entre nucleótidos opuestos. Si es necesario, se especificará el porcentaje de complementariedad. Habitualmente, las dos moléculas se seleccionan de modo que se hibriden bajo condiciones de alta severidad.

Como se usa en la presente, un agente que modula la actividad de una proteína o expresión de un gen o ácido nucleico disminuye o aumenta o altera de otro modo la actividad de la proteína o, de alguna manera, regula por incremento o regula por disminución o altera de otro modo la expresión del ácido nucleico en una célula.

Como se usa en la presente, una proteasa de “proteína quimérica” o “proteína de

fusión" se refiere a un polipéptido unido operativamente a un polipéptido diferente. Una proteína quimérica o de fusión proporcionada en la presente puede incluir una o más proteasas o una parte de las mismas, tal como dominios de proteasa de cadena individual de los mismos, y uno o más polipéptidos adicionales para cualquiera de una o más señales de control transcripcionales/traduccionales, secuencias de señales, una etiqueta para localización, una etiqueta para purificación, parte de un dominio de una inmunoglobulina G y/o un agente de direccionamiento. Estas proteínas quiméricas o de fusión incluyen aquellas producidas por medios recombinantes como proteínas de fusión, aquellas producidas por medios químicos, tal como por acoplamiento químico, a través, por ejemplo, de acoplamiento a grupos sulfhidrilo, y aquellas producidas por cualquier otro método mediante el cual al menos una proteasa, o una parte de la misma, está unida, directa o indirectamente a través de ligadores a otro polipéptido.

Como se usa en la presente, unido operativamente cuando se refiere a una proteína de fusión se refiere a un polipéptido de proteasa y un polipéptido sin proteasa que se fusionan dentro del marco entre sí. El polipéptido no de proteasa se puede fusionar al extremo N-terminal o extremo C-terminal del polipéptido de proteasa.

Como se usa en la presente, un agente de direccionamiento es cualquier porción, tal como una proteína o porción eficaz de la misma, que proporciona unión específica del conjugado a un receptor de superficie celular, que en algunos casos puede internalizar conjugados unidos o porciones de los mismos. Un agente de direccionamiento también puede ser uno que promueve o facilita, por ejemplo, el aislamiento o purificación por afinidad del conjugado; unión del conjugado a una superficie; o detección del conjugado o complejos que contienen el conjugado.

Como se usa en la presente, "ligador" se refiere a secuencias cortas de aminoácidos que se unen a dos polipéptidos (o ácido nucleico que codifica para estos polipéptidos). "Ligador de péptido" se refiere a la secuencia corta de aminoácidos que une las dos secuencias de polipéptido. Los ejemplos de ligadores de polipéptido son ligadores que unen dos cadenas de anticuerpos en un fragmento de anticuerpo sintético tal como un fragmento scFv. Los ligadores se conocen y se puede utilizar cualquier ligador conocido en los métodos proporcionados. Los ejemplos de ligadores de polipéptido son secuencias de aminoácidos $(Gly\text{-}Ser)_n$, con algunos residuos de Glu o Lys dispersos para aumentar la solubilidad. Otros ligadores de ejemplo se describen en la presente; cualquiera de estos y otros ligadores conocidos se pueden usar con las composiciones y métodos proporcionados.

Como se usa en la presente, el derivado o análogo de una molécula se refiere a una porción derivada de o una versión modificada de la molécula.

Como se usa en la presente, "enfermedad o trastorno" se refiere a una condición patológica en un organismo que resulta de causa o condición que incluye, pero no se limita a, infecciones, condiciones adquiridas, condiciones genéticas, condiciones relacionadas con exposiciones ambientales y comportamientos humanos, y condiciones caracterizadas por síntomas identificables. Las enfermedades o trastornos incluyen enfermedades clínicamente diagnosticadas, así como trastornos en el estado normal del organismo que no se han diagnosticado como enfermedad clínica. Las enfermedades y trastornos de interés en la presente son aquellos que implican la activación del complemento, incluidos aquellos mediados por la activación del complemento y aquellos en los que la activación del complemento juega un papel en la etiología o patología. Las enfermedades y trastornos de interés en la presente incluyen aquellos caracterizados por la activación del complemento (por ejemplo, degeneración macular relacionada con la edad y función retardada de injerto renal).

Como se usa en la presente, la degeneración macular se presenta cuando la pequeña porción central de la retina, conocida como la mácula, se deteriora. Hay dos tipos de AMD: seca (atrófica) y húmeda (neovascular o exudativa). La mayoría de la AMD comienza como el tipo seco y en el 10-20% de los individuos, progresa al tipo húmedo. La degeneración macular relacionada con la edad siempre es bilateral (es decir, se presenta en ambos ojos), pero no necesariamente progresa al mismo ritmo en ambos ojos.

Como se usa en la presente, la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es una enfermedad inflamatoria que provoca discapacidad visual y ceguera en personas mayores. Las proteínas del sistema de complemento son centrales para el desarrollo de esta enfermedad. La inflamación local y sistémica en la AMD se medía por la acción desregulada de la vía alternativa del sistema de complemento.

Como se usa en la presente, la función retardada de injerto (DGF) es una manifestación de lesión renal aguda (AKI) con atributos exclusivos del proceso de trasplante. Se presenta después de la cirugía de trasplante. La función retardada de injerto (DGF) es una complicación común frecuentemente definida como la necesidad de diálisis durante la primera semana posterior al trasplante. La síntesis renal intrínseca del tercer componente C3 de complemento (C3) contribuye al rechazo agudo mediante el cebado de una respuesta mediada por células T. Por ejemplo, en donantes con muerte cerebral, los niveles locales de C3 renal son más altos en la obtención e inversamente relacionados con la función renal 14 días después del trasplante.

Como se usa en la presente, una enfermedad o trastorno mediado por complemento es cualquier trastorno en el cual cualquiera o más de las proteínas de complemento juegan un papel en la enfermedad, ya sea debido a una ausencia o presencia

de una proteína de complemento o proteína relacionada con el complemento o activación o inactivación de un complemento o proteína relacionada con el complemento. En algunas modalidades, un trastorno mediado por complemento es uno que se debe a una deficiencia en una o más proteínas de complemento. En otras modalidades, como se describe en la presente, un trastorno mediado por complemento es uno que se debe a la activación o sobreactivación de una o más proteínas de complemento. Un trastorno mediado por complemento también es aquel que se debe a la presencia de cualquiera o más de las proteínas de complemento y/o la activación continua de la vía de complemento.

Como se usa en la presente, “trastorno relacionado con degeneración macular” se refiere a cualquiera de una cantidad de condiciones en las que la mácula retiniana se degenera o se vuelve disfuncional (por ejemplo, como consecuencia de la disminución del crecimiento de las células de la mácula, mayor muerte o reordenamiento de las células de la mácula (por ejemplo, células RPE), pérdida de la función biológica normal o una combinación de estos eventos). La degeneración macular resulta en la pérdida de integridad de la histoarquitectura de las células y/o matriz extracelular de la mácula normal y/o la pérdida de función de las células de la mácula. Los ejemplos de trastornos relacionados con la degeneración macular incluyen degeneración macular relacionada con la edad (AMD), atrofia geográfica (GA), distrofia macular de Carolina del Norte, distrofia de fondo de ojo de Sorsby, enfermedad de Stargardt, distrofia de patrón, enfermedad de Best, drusas dominantes y malatia leventina). El trastorno relacionado con la degeneración macular también abarca los cambios extramaculares que se presentan antes o después de la disfunción y/o degeneración de la mácula. Por lo tanto, el término “trastorno relacionado con la degeneración macular” también incluye ampliamente cualquier condición que altere o dañe la integridad o función de la mácula (por ejemplo, daño al RPE o a membrana de Bruch). Por ejemplo, el término comprende desprendimiento de retina, degeneraciones coriorretinianas, degeneraciones retinianas, degeneraciones fotorreceptoras, degeneraciones de RPE, mucopolisacaridosis, distrofias de cono de varilla, distrofias de cono de varilla y degeneraciones de cono.

Un trastorno relacionado con degeneración macular descrito en la presente incluye degeneración macular, tal como, por ejemplo, degeneración macular de AMD. Un trastorno relacionado con la degeneración macular incluye trastornos tratados mediante tratamiento anti-VEGF, tal como, por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF, o tratamiento con láser o un telescopio implantable.

Como se usa en la presente, "tratar" a un sujeto con una enfermedad o condición significa que los síntomas del sujeto se alivian parcial o totalmente, o permanecen estáticos después del tratamiento. Por lo tanto, el tratamiento abarca profilaxis, terapia y/o cura. La

profilaxis se refiere a la prevención de una enfermedad potencial y/o una prevención del empeoramiento de los síntomas o la progresión de una enfermedad. El tratamiento también comprende cualquier uso farmacéutico de un polipéptido de u-PA modificado y composiciones proporcionadas en la presente.

Como se usa en la presente, “prevención” o "profilaxis" se refiere a métodos en los que se reduce el riesgo o la probabilidad de desarrollar una enfermedad o condición.

Como se usa en la presente, un “agente terapéutico”, "régimen terapéutico", "radioprotector" o "quimioterapéutico" se refiere a fármacos convencionales y terapias farmacológicas, incluidas vacunas, que son conocidas por los expertos en la técnica. Los agentes radioterapéuticos se conocen bien en la técnica.

Como se usa en la presente, “tratamiento” significa cualquier manera en la que los síntomas de una condición, trastorno o enfermedad se mejoran o de otra manera se alteran beneficiosamente. El tratamiento también comprende cualquier uso farmacéutico de las composiciones de la presente.

Como se usa en la presente, “mejora de los síntomas” de una enfermedad o trastorno particular mediante un tratamiento, tal como mediante la administración de una composición farmacéutica u otro producto terapéutico, se refiere a cualquier disminución, ya sea permanente o temporal, duradera o transitoria, de los síntomas que se pueden atribuir o asociar con la administración de la composición o producto terapéutico.

Como se usa en la presente, un “agente farmacéuticamente efectivo” incluye cualquier agente terapéutico o agentes bioactivos, incluidos, pero no se limitan a, por ejemplo, anestésicos, vasoconstrictores, agentes dispersantes y fármacos terapéuticos convencionales, incluidos fármacos de moléculas pequeñas y proteínas terapéuticas.

Como se usa en la presente, una “cantidad efectiva” de un compuesto o composición para tratar una enfermedad particular es una cantidad que es suficiente para mejorar o de alguna manera reducir los síntomas asociados con la enfermedad. Esta cantidad se puede administrar como una dosificación individual o se puede administrar de acuerdo con un régimen, mediante el cual es efectivo. La cantidad puede curar la enfermedad pero, habitualmente, se administra con el fin de mejorar los síntomas de la enfermedad. Habitualmente, se requiere administración repetida para lograr una mejora deseada de los síntomas.

Como se usa en la presente, una “cantidad terapéuticamente efectiva” o una "dosis terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de un agente, compuesto, material o composición que contiene un compuesto que es al menos suficiente para producir un efecto terapéutico después de la administración a un sujeto. Por lo tanto, es la cantidad necesaria

para prevenir, curar, mejorar, detener o detener parcialmente un síntoma de una enfermedad o trastorno.

Como se usa en la presente, un “efecto terapéutico” significa un efecto resultante del tratamiento de un sujeto que altera, típicamente mejora o mejora, los síntomas de una enfermedad o condición o que cura una enfermedad o condición.

Como se usa en la presente, una “cantidad profilácticamente efectiva” o una “dosis profilácticamente efectiva” se refiere a la cantidad de un agente, compuesto, material o composición que contiene un compuesto que, cuando se administra a un sujeto, tiene el efecto profiláctico previsto, por ejemplo, prevenir o retrasar el inicio o la reaparición de la enfermedad o los síntomas, reducir la probabilidad del inicio o reaparición de la enfermedad o los síntomas, o reducir la incidencia de infección viral. El efecto profiláctico completo no se presenta necesariamente mediante la administración de una dosis, y puede presentarse solo después de la administración de una serie de dosis. Por lo tanto, se puede administrar una cantidad profilácticamente efectiva en una o más administraciones.

Como se usa en la presente, “administración de una proteasa no complementaria”, tal como una proteasa de u-PA modificada, se refiere a cualquier método en el cual la proteasa no complementaria se pone en contacto con su sustrato. La administración se puede efectuar *in vivo* o *ex vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, para la administración *ex vivo*, se retira un fluido corporal, tal como sangre, de un sujeto y se pone en contacto fuera del cuerpo con la proteasa no complementaria modificada, tal como una proteasa de u-PA modificada. Para administración *in vivo*, la proteasa no complementaria modificada, tal como una proteasa de u-PA modificada, se puede introducir en el cuerpo, tal como por vía de introducción local, tópica, sistémica y/u otra vía de introducción. La administración *in vitro* abarca métodos, tal como métodos de cultivo celular.

Como se usa en la presente, “forma de dosis unitaria” se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas para sujetos humanos y animales y envasadas individualmente como se conoce en la técnica.

Como se usa en la presente, "paciente" o "sujeto" que se va a tratar incluye seres humanos y animales humanos o no humanos. Los mamíferos incluyen; primates, tal como humanos, chimpancés, gorilas y monos; animales domesticados, tal como perros, caballos, gatos, cerdos, cabras y vacas; y roedores tal como ratones, ratas, hámsteres y jerbos.

Como se usa en la presente, una “combinación” se refiere a cualquier asociación entre dos o más elementos. La asociación puede ser espacial o referirse al uso de los dos o más elementos para un propósito común. La combinación puede ser dos o más artículos separados, tal como dos composiciones o dos colecciones, una mezcla de los mismos, tal

como una sola mezcla de los dos o más artículos, o cualquier variación de los mismos. Los elementos de una combinación en general están asociados o relacionados funcionalmente.

Como se usa en la presente, una “composición” se refiere a cualquier mezcla de dos o más productos o compuestos (por ejemplo, agentes, moduladores, reguladores, etc.). Puede ser una solución, una suspensión, líquido, polvo, una pasta, formulaciones acuosas o no acuosas o cualquier combinación de los mismos.

Como se usa en la presente, un agente estabilizante se refiere al compuesto agregado a la formulación para proteger el anticuerpo o conjugado, tal como bajo las condiciones (por ejemplo, temperatura) en las cuales se almacenan o usan las formulaciones en la presente. De esta manera, se incluyen agentes que previenen la degradación de proteínas de otros componentes en las composiciones. Los ejemplos de estos agentes son aminoácidos, derivados de aminoácidos, aminas, azúcares, polioles, sales y amortiguadores, agentes tensioactivos, inhibidores o sustratos y otros agentes como se describe en la presente.

Como se usa en la presente, "fluido" se refiere a cualquier composición que puede fluir. De esta manera, los fluidos abarcan composiciones que se encuentran en la forma de semisólidos, pastas, soluciones, mezclas acuosas, geles, lociones, cremas y otras composiciones similares.

Como se usa en la presente, un “artículo de manufactura” es un producto que se fabrica y vende. Como se usa a lo largo de esta solicitud, el término pretende abarcar un agente terapéutico con un polipéptido de u-PA modificado o molécula de ácido nucleico contenida en el mismo o artículos separados de envasado.

Como se usa en la presente, un “kit” se refiere a una combinación envasada, que incluye opcionalmente reactivos y otros productos y/o componentes para practicar los métodos usando los elementos de la combinación. Por ejemplo, se proporcionan kits que contienen un polipéptido de proteasa modificada, tal como una proteasa de u-PA modificada proporcionada en la presente, o molécula de ácido nucleico proporcionada en la presente y otro elemento para un propósito que incluye, pero no se limita a, administración, diagnóstico y valoración de una actividad o propiedad biológica. Los kits opcionalmente incluyen instrucciones de uso.

Como se usa en la presente, un “extracto celular” se refiere a una preparación o fracción que se hace a partir de una célula lisada o alterada.

Como se usa en la presente, “animal” incluye cualquier animal, tal como, pero no se limita a; primates que incluyen seres humanos, gorilas y monos; roedores, tal como ratones y ratas; aves, tal como pollos; rumiantes, tal como cabras, vacas, ciervos, ovejas; porcinos,

tal como cerdos y otros animales. Los animales no humanos excluyen a los humanos como el animal contemplado. Las proteasas proporcionadas en la presente son de cualquier fuente, animal, planta, procariota y fúngica. La mayoría de las proteasas son de origen animal, incluido el origen mamífero.

Como se usa en la presente, una formulación de “dosis individual” se refiere a una formulación que contiene una dosis individual de agente terapéutico para administración directa. Las formulaciones de dosis individual en general no contienen ningún conservador.

Como se usa en la presente, una formulación multidosis se refiere a una formulación que contiene múltiples dosis de un agente terapéutico y que se puede administrar directamente para proporcionar varias dosis individual del agente terapéutico. Las dosis se pueden administrar en el transcurso de minutos, horas, semanas, días o meses. Las formulaciones multidosis pueden permitir el ajuste de la dosis, la mezcla de dosis y/o la división de dosis. Debido a que las formulaciones multidosis se utilizan con el paso del tiempo, en general contienen uno o más conservadores para prevenir el crecimiento microbiano.

Como se usa en la presente, un “control” o “estándar” se refiere a una muestra que es sustancialmente idéntica a la muestra de prueba, excepto que no se trata con un parámetro de prueba o, si es una muestra de plasma, puede ser de un voluntario normal no afectado con la condición de interés. Un control también puede ser un control interno. Por ejemplo, un control puede ser una muestra, tal como un virus, que tiene una propiedad o actividad conocida.

Como se usa en la presente, las formas singulares “un", "una" “la” y “el" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De esta manera, por ejemplo, la referencia a “un” agente incluye uno o más agentes.

Como se usa en la presente, el término "o" se usa para dará a entender "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiere solo a alternativas o si las alternativas son mutuamente excluyentes.

Como se usa en la presente, los intervalos y cantidades se pueden expresar como “aproximadamente” un valor o intervalo particular. Aproximadamente también incluye la cantidad exacta. Por lo tanto, “aproximadamente 5 bases” significa “aproximadamente 5 bases” y también “5 bases”.

Como se usa en la presente, “opcional” u “opcionalmente” significa que el evento o circunstancia descrita posteriormente se presenta o no se presenta, y que la descripción incluye casos donde se presenta ese evento o circunstancia y casos donde no se presenta. Por ejemplo, un grupo opcionalmente sustituido significa que el grupo no está sustituido o está sustituido.

Como se usa en la presente, las abreviaturas de cualquier grupo protector, aminoácidos y otros compuestos, están, a menos que se indique lo contrario, de acuerdo con su uso común, abreviaturas reconocidas o la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB (ver, (1972) *Biochem*. 11:1726).

Para mayor claridad de la descripción, y no a modo de limitación, la descripción detallada se divide en las subsecciones que siguen.

B. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE U-PA

El activador de plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA, también llamado activador de plasminógeno urinario o uroquinasa) es una serina-proteinasa que cataliza la hidrólisis de plasminógeno en plasmina. u-PA se encuentra en orina, sangre, fluidos seminales y en muchos tejidos cancerosos. Está comprendido en una variedad de procesos biológicos, que están vinculados a su conversión de plasminógeno en plasmina, que a su vez es una serina proteasa. La plasmina tiene funciones en una variedad de procesos normales y patológicos que incluyen, por ejemplo, migración celular y destrucción de tejido a través de su escisión de una variedad de moléculas que incluyen fibrina, fibronectina, proteoglicanos y laminina. u-PA está comprendido en la remodelación de tejido durante la cicatrización de heridas, migración celular inflamatoria, neovascularización e invasión de células tumorales. u-PA también escinde y activa otros sustratos, incluidos, pero no se limitados a, factor de crecimiento/dispersión de hepatocitos (HGF/SF), la forma latente de metaloproteasa de matriz tipo 1 de membrana (MT-SP1), factores de crecimiento derivados de plaquetas y otros.

En la presente se proporcionan polipéptidos de activador de plasminógeno (u-PA) tipo uroquinasa modificados que se modifican de modo que escinden secuencias inhibidoras en C3, de modo que se inhiba la activación de C3 en fragmentos C3a y C3b. La actividad/especificidad de los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente es tal que escinden C3 con mayor actividad y/o especificidad o k_{cat}/k_m en comparación con el polipéptido de u-PA no modificado, particularmente de cualquiera de SEQ ID NO: 1-6. Los polipéptidos de u-PA modificados también pueden tener actividad o especificidad reducida o ambas para un plasminógeno de sustrato fisiológico natural del polipéptido de u-PA no modificado. De esta manera, los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente inhiben la activación del complemento en una vía de complemento. Los polipéptidos de u-PA modificados también exhiben una mayor selectividad para escindir C3 en comparación con otros sustratos de u-PA, tal como plasminógeno. Por lo tanto, los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente no exhiben actividades de escisión no deseadas contra sustratos de u-PA naturales fisiológicos de modo que no exhiban efectos secundarios no deseados. En algunas modalidades, el polipéptido de u-PA modificado

es un dominio de proteasa o una forma de cadena individual; en esos casos, la cisteína libre (posición de residuo 122 por numeración de quimotripsina) se reemplaza con una serina, para disminuir o eliminar la agregación luego de la preparación de la proteína. En modalidades en las que el polipéptido u-PA modificado es de longitud completa u otra forma en la que se activa por escisión, el residuo en la posición 122 (por numeración de quimotripsina) en general no se reemplaza con S de modo que el enlace de disulfuro se pueda formar para producir el polipéptido activado de dos cadenas.

1. Serina Proteasas

Las serinas proteasas (SP), que incluyen enzimas secretadas y enzimas secuestradas en organelos de almacenamiento citoplasmático, tienen una variedad de funciones fisiológicas, incluso en la coagulación sanguínea, cicatrización de heridas, digestión, respuestas inmunitarias e invasión tumoral y metástasis. Por ejemplo, la quimotripsina, tripsina y elastasa funcionan en el tracto digestivo; el Factor 10, Factor 11, Trombina y Plasmina están involucrados en la coagulación y cicatrización de heridas; y C1r, C1s, las C3-conversasas juegan un papel en la activación del complemento.

Una clase de proteínas de superficie celular designadas serina proteasas transmembrana tipo II son proteasas que son proteínas ancladas a la membrana con dominios extracelulares. Como proteínas de superficie celular, desempeñan un papel en la transducción de señales intracelulares y en la mediación de eventos proteolíticos de superficie celular. Otras serina proteasas se unen a la membrana y funcionan de manera similar. Otras se secretan. Muchas serina proteasas ejercen su actividad al unirse a receptores de superficie celular y, por lo tanto, actúan en superficies celulares. La proteólisis de superficie celular es un mecanismo para la generación de proteínas biológicamente activas que median una variedad de funciones celulares.

Las serina proteasas, incluidas serina proteasas secretadas y transmembrana, están involucradas en procesos que incluyen desarrollo neoplásico y progresión. Si bien el papel preciso de estas proteasas no se ha elaborado completamente, las serina proteasas y sus inhibidores están involucrados en el control de muchos procesos fisiológicos intra y extracelulares, incluidas las acciones degradativas en la invasión de células cancerosas y diseminación metastásica, y neovascularización de tumores que están involucrados en la progresión tumoral. Las proteasas están involucradas en la degradación y remodelación de la matriz extracelular (ECM) y contribuyen a la remodelación de tejidos, y son necesarias para la invasión y metástasis del cáncer. Se ha demostrado que la actividad y/o expresión de algunas proteasas se correlaciona con la progresión y el desarrollo del tumor.

Se han identificado más de 20 familias (denotadas S1-S27) de serina proteasa, y

se agrupan en 6 clanes (SA, SB, SC, SE, SF y SG) sobre la base de similitud estructural y otra evidencia funcional (Rawlings ND *et al*. (1994) *Meth. Enzymol*. 244: 19-61). Hay similitudes en los mecanismos de reacción de varias serina peptidasas. Los clanes quimotripsina, subtilisina y carboxipeptidasa C tienen una tríada catalítica de serina, aspartato e histidina en común: la serina actúa como un nucleófilo, el aspartato como un electrófilo y la histidina como una base. Las orientaciones geométricas de los residuos catalíticos son similares entre familias, a pesar de diferentes pliegues proteicos. Las disposiciones lineales de los residuos catalíticos reflejan comúnmente las relaciones de clan. Por ejemplo, la tríada catalítica en el clan quimotripsina (SA) se ordena HDS, pero se ordena DHS en el clan subtilisina (SB) y SDH en el clan carboxipeptidasa (SC).

Los ejemplos de serina proteasas de la superfamilia de quimotripsina incluyen activador de plasminógeno tipo tejido (tPA), tripsina, proteasa similar a tripsina, quimotripsina, plasmina, elastasa, uroquinasa (o activador de plasminógeno tipo urinario, u-PA), acrosina, proteína C activada, esterasa C1, cathepsina G, quimasa y proteasas de la cascada de coagulación sanguínea incluidas calicreína, trombina y Factores VIIa, IXa, Xa, XIa y XIIa (Barret, A.J., In: *Proteinase Inhibitors*, Ed. Barrett, A.J., *et al.*, Elsevier, Amsterdam, Pages 3-22 (1986); Strassburger, W. *et al*., (1983) *FEBS Lett*., 157 :219-223; Dayhoff, M.O., Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol 5, National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Md. (1972); y Rosenberg, R.D. *et al*. (1986) *Hosp. Prac*., 21: 131-137).

La actividad de proteasas en la familia de serina proteasas depende de un conjunto de residuos de aminoácidos que forman su sitio activo. Uno de los residuos es siempre una serina; de ahí su designación como serina proteasas. Por ejemplo, quimotripsina, tripsina y elastasa comparten una estructura similar y su residuo de serina activo está en la misma posición (Ser195) en los tres. A pesar de sus similitudes, tienen diferentes especificidades de sustrato; se escinden diferentes enlaces peptídicos durante la digestión de proteínas. Por ejemplo, quimotripsina prefiere una cadena lateral aromática en el residuo cuyo carbono carbonilo es parte del enlace peptídico que se va a escindir. La tripsina prefiere un residuo Lys o Arg cargado positivamente en esta posición. Las serina proteasas difieren notablemente en sus propiedades de reconocimiento de sustratos: algunas son altamente específicas (es decir, las proteasas involucradas en la coagulación sanguínea y en el sistema de complemento inmunitario); algunas son solo parcialmente específicas (es decir, las proteasas digestivas de mamíferos tripsina y quimotripsina); y otras, como la subtilisina, una proteasa bacteriana, son completamente inespecíficas. A pesar de estas diferencias en la especificidad, el mecanismo catalítico de las serina proteasas está bien conservado.

El mecanismo de escisión de una proteína diana por una serina proteasa se basa

en el ataque nucleofílico del enlace peptídico diana por una serina. Las moléculas de cisteína, treonina o agua asociadas con aspartato o metales también pueden desempeñar este papel. En muchos casos, la propiedad nucleofílica del grupo se mejora mediante la presencia de una histidina, mantenida en un "estado aceptor de protones" por un aspartato. Las cadenas laterales alineadas de serina, histidina y aspartato construyen la tríada catalítica común a la mayoría de las serina proteasas. Por ejemplo, los residuos del sitio activo de quimotripsina y serina proteasas que son miembros de la misma familia que quimotripsina, tal como, por ejemplo, MTSP-1, son Asp102, His57 y Ser195.

Los dominios catalíticos de todas las serina proteasas de la superfamilia quimotripsina tienen homología de secuencia y homología estructural. La homología de secuencia incluye la conservación de: 1) los residuos de sitio activo característicos (por ejemplo, Ser195, His57 y Asp102 en el caso de tripsina); 2) el orificio de oxianión (por ejemplo, Gly193, Asp194 en el caso de tripsina); y 3) los residuos de cisteína que forman puentes de disulfuro en la estructura (Hartley, B.S., (1974) *Symp*. *Soc. Gen. Microbiol*., 24: 152-182). La homología estructural incluye 1) un pliegue común caracterizado por dos estructuras clave griegas (Richardson, J. (1981) *Adv*. *Prot. Chem*., 34:167-339); 2) una disposición común de residuos catalíticos; y 3) preservación detallada de la estructura dentro del núcleo de la molécula (Stroud, R.M. (1974) *Sci. Am.*, 231: 24-88).

A lo largo de la familia de quimotripsinas de serina proteasas, la interacción principal entre el sustrato y la enzima se conserva completamente, pero las interacciones de cadena lateral varían considerablemente. La identidad de los aminoácidos que contienen las cavidades S1-S4 del sitio activo determina la especificidad del sustrato de esa cavidad particular. El injerto de los aminoácidos de una serina proteasa a otra del mismo pliegue modifica la especificidad de una a la otra. Habitualmente, los aminoácidos de la proteasa que contienen las cavidades S1-S4 son aquellos que tienen cadenas laterales dentro de 4 a 5 angstroms del sustrato. Las interacciones que estos aminoácidos tienen con el sustrato de proteasa en general se denominan interacciones de “primera capa” porque entran en contacto directo con el sustrato. Sin embargo, puede haber interacciones de “segunda capa” y “tercera capa” que finalmente posicionan los primeros aminoácidos de capa. Los efectos de unión del substrato de la primera capa y la segunda capa se determinan principalmente mediante bucles entre dominios beta-barril. Debido a que estos bucles no son elementos centrales de la proteína, la integridad del pliegue se mantiene en tanto que las variantes de bucle con nuevas especificidades de sustrato se pueden seleccionar durante el curso de la evolución para cumplir con los nichos metabólicos o reguladores necesarios a nivel molecular. Habitualmente para las serina proteasas, los siguientes aminoácidos en la secuencia primaria son

determinantes de la especificidad: 195, 102, 57 (la tríada catalítica); 189, 190, 191, 192 y 226 (S1); 57, el bucle entre 58 y 64, y 99 (S2); 192, 217, 218 (S3); el bucle entre Cys168 y Cys180, 215, y 97 a 100 (S4); y 41 y 151 (S2'), con base en la numeración de quimotripsina, donde un aminoácido en una posición S1 afecta la especificidad P1, un aminoácido en una posición S2 afecta la especificidad P2, un aminoácido en la posición S3 afecta la especificidad P3, y un aminoácido en la posición S4 afecta la especificidad P4. La posición 189 en una serina proteasa es un residuo enterrado en el fondo de la cavidad que determina la especificidad S1. Los determinantes estructurales para u-PA se listan en la Tabla 4, con dominios de proteasa para cada una de las proteasas designadas alineadas con la del dominio de proteasa de quimotripsina. El número debajo de los encabezados de columna del bucle Cys168-Cys182 y 60 indica el número de aminoácidos en el bucle entre los dos aminoácidos y en el bucle. La designación sí/no bajo los encabezados de columna Cys191-Cys220 indica si el puente de disulfuro está presente en la proteasa. Estas regiones son variables dentro de la familia de serina proteasas similares a quimotripsina y representan determinantes estructurales en sí mismos.

2. Estructura

El ADNc de u-PA se ha clonado de numerosas especies de mamíferos. Los polipéptidos precursores de u-PA de ejemplo, o polipéptidos prepro-uroquinasa incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de u-PA de humano (SEQ ID NO:1 y codificados por SEQ ID NO:7), ratón (SEQ ID NO:52), rata (SEQ ID NO:53), bovino (SEQ ID NO:54), cerdo (SEQ ID NO:55), conejo (SEQ ID NO:56), pollo (SEQ ID NO:57), babuino amarillo (SEQ ID NO:58), orangután de Sumatra (SEQ ID NO:59), perro (SEQ ID NO:60), ovino (SEQ ID NO: 61), titi (SEQ ID NO: 62), macaco rhesus (SEQ ID NO:63), gibón de mejillas blancas del norte (SEQ ID NO:64) y chimpancé (SEQ ID NO:65). La transcripción de ARNm se traduce habitualmente para generar una proteína precursora que contiene una secuencia señal de 20 aminoácidos en el extremo N-terminal. Después del transporte al ER, el péptido de señal se retira para proporcionar un polipéptido de prouroquinasa. Los ejemplos de polipéptidos de prouroquinasa incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de u-PA de humano (SEQ ID NO:3), de ratón (SEQ ID NO:66), de rata (SEQ ID NO:67), bovino (SEQ ID NO:68), de cerdo (SEQ ID NO:69), de conejo (SEQ ID NO:70), de pollo (SEQ ID NO:71), de babuino amarillo (SEQ ID NO:72), de orangután de Sumatra (SEQ ID NO:73), de perro (SEQ ID NO:74) y ovino (SEQ ID NO:75). Por ejemplo, la transcripción de ARNm de u-PA humano se traduce normalmente para formar una proteína precursora de 431 aminoácidos (SEQ ID NO:1) que contiene una secuencia señal de 20 aminoácidos en el extremo N-terminal, Met Arg Ala Leu Leu Ala Arg Leu Leu Cys Val Leu Val Ser Asp Ser Lys Gly (residuos de aminoácidos 1-20 de SEQ ID NO:1). De esta

manera, luego del transporte al ER y de la eliminación del péptido de señal, se produce un polipéptido de prouroquinasa de 411 aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:3. Como se describe con más detalle más adelante, la prouroquinasa es un zimógeno o proenzima que se procesa adicionalmente mediante escisión proteolítica para generar un polipéptido de u-PA maduro de dos cadenas. De esta manera, por ejemplo, con referencia a u-PA maduro (SEQ ID NO:3), el u-PA activado de cadena tipo silvestre contiene una primera cadena (cadena A), residuos 1-158 unidos por disulfuro a los residuos 159-411 (cadena B) a través de un enlace de disulfuro entre Cys148 (numeración de quimotripsina C97a) y Cys279 (numeración de quimotripsina C122). Por lo tanto, en los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente, cuando se produce el dominio proteasa, contiene el reemplazo C122S, pero cuando se produce una forma activada que es una forma de 2 cadenas, el residuo en 122 (numeración de quimotripsina) es C de modo que forma un enlace de disulfuro con otro C, en general en la secuencia de activación (ver análisis posterior y Ejemplo 15).

El precursor humano u-PA tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:1 y codificada por una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:7. El pro-u-PA humano, también denominado u-PA maduro, que carece de la secuencia de señal se expone en SEQ ID NO:3. Existen dos isoformas de u-PA humano, producidas por empalme alternativo. La isoforma 1 de u-PA humano es la forma canónica descrita anteriormente expuesta en SEQ ID NO:1. En la isoforma 2 de u-PA humano, los aminoácidos 1-29 de SEQ ID NO:1 se reemplazan con los aminoácidos 1-12 de SEQ ID NO: 51, con la proteína resultante que contiene 414 aminoácidos (expuesta en SEQ ID NO:51). Se conocen variantes alérgicas y otras variantes de u-PA humano. Por ejemplo, se conoce una variante de uPA que contiene la modificación de aminoácidos V15L en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:1. En otro ejemplo, se conoce un polipéptido de u-PA modificado que contiene la modificación de aminoácidos C299S (C122S mediante numeración de quimotripsina) en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:1 (correspondiente a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4). Las variantes adicionales incluyen aquellas que contienen modificaciones de aminoácidos P121L, D130G, C131W, I194M, K211Q, G366c y A410V en u-PA maduro expuesto en SEQ ID NO:3 (correspondiente a modificaciones de aminoácidos P141L, D150G, C151W, I214M, K231Q, G386C y A430V en SEQ ID NO:1).

Los polipéptidos de u-PA se sintetizan y secretan como moléculas de zimógenos de cadena individual (también llamadas prouroquinasas o uroquinasas de cadena individual), que se convierten en u-PA de doble cadena activos mediante una variedad de proteasas que incluyen, por ejemplo, plasmina, calicreína, catepsina B, matriptasa y factor de crecimiento

nervioso gamma. La escisión para generar la forma de dos cadenas se presenta entre los residuos 158 y 159 (SEQ ID NO:3) en la secuencia de prouroquinasa humana (correspondiente a los residuos de aminoácidos 178 y 179 en SEQ ID NO:1). Las dos cadenas resultantes están unidas por un enlace de disulfuro entre Cys148 y Cys279, formando de esta manera la forma de dos cadenas de u-PA. La forma de dos cadenas de u-PA también se llama u-PA de alto peso molecular (HMW-u-PA). HMW-u-PA se puede procesar adicionalmente en u-PA de bajo peso molecular (LMW-u-PA) mediante escisión de la cadena A en una cadena corta A (A1, aminoácidos 136-157 de SEQ ID NO:3) y un fragmento amino-terminal. Disulfuro enlazado 21-178 a 179-411 enlazado mediante Cys correspondiente a Cys148 y Cys279 (SEQ ID NO:3).

El activador de plasminógeno tipo uroquinasa, u-PA, es una serina proteasa clásica, que contiene una tríada catalítica His-Asp-Ser, que escinde un enlace Arg-Val específico en plasminógeno para formar plasmina. La plasmina, a su vez, puede escindir u-PA en Lys158-Ile159 de SEQ ID NO: 3 (correspondiente a Lys15-Ile16 mediante numeración de quimotripsina) formando la forma de dos cadenas descrita anteriormente. La tríada catalítica de u-PA humano incluye los aminoácidos His204, Asp255 y Ser356 de SEQ ID NO: 3 (correspondiente a His57, Asp102 y Ser195 mediante numeración de quimotripsina). Los residuos Ser138 y Ser303 del uPA humano expuestos en SEQ ID NO:3 se fosforilan (Franco *et al.* (1997) *J Cell Biol* 137:779-791). u-PA humano contiene glicosilación unida a O, por ejemplo, fucosilación, en el residuo de aminoácido Thr18 de SEQ ID NO: 3 (Buko *et al.* (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3992-3996) y glicosilación unida a N en el residuo de aminoácidos Asn302 de SEQ ID NO:3. El u-PA humano maduro contiene enlaces de disulfuro intracadena entre los residuos C11-C19, C13-C31, C33-C42, C50-C131, C71-C113, C102-C126, C189-C205, C197-C268, C293-C362, C325-C341 y C352-C380 de SEQ ID NO:3 y un enlace de disulfuro intercadena entre los residuos C148-C279 de SEQ ID NO:3.

La forma madura de u-PA es una proteína de 411 residuos (correspondiente a residuos de aminoácidos 21 a 431 en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:1 que es la forma precursora que contiene un péptido de señal de 20 aminoácidos). u-PA contiene tres dominios: el dominio de serina proteasa, el dominio kringle y el dominio de factor de crecimiento. En la forma madura de u-PA humano, los aminoácidos 1-158 representan la cadena A N-terminal que incluye un dominio de factor de crecimiento (aminoácidos 1-49), un dominio kringle (aminoácidos 50-131) y una región de ligador interdominio (aminoácidos 132-158). Los aminoácidos 159-411 representan el dominio de serina proteasa C-terminal o cadena B. u-PA se sintetiza y secreta como una molécula de zimógeno de cadena individual, que se convierte en un u-PA de doble cadena activo mediante una variedad de proteasas que

incluyen, por ejemplo, plasmina, calicreína, catepsina B y factor de crecimiento nervioso gamma. La escisión en la forma de dos cadenas se presenta entre los residuos 158 y 159 en una secuencia de u-PA maduro (que corresponde a los residuos de aminoácidos 178 y 179 en SEQ ID NO:3). Las dos cadenas resultantes se mantienen conjuntamente mediante un enlace de disulfuro, formando de esta manera la forma de dos cadenas de u-PA.

Los activadores de plasminógeno tipo uroquinasa contienen tres dominios: un dominio de serina proteasa, un dominio kringle y un dominio de factor de crecimiento. En la forma zimógena o proenzima de u-PA humano, los aminoácidos 1-158 de SEQ ID NO:3 representan la cadena A N-terminal (o cadena A larga) que incluye un dominio del factor de crecimiento epidérmico (aminoácidos 1-49), un dominio kringle (aminoácidos 50-131) y una región de ligador interdominio (aminoácidos 132-158) y aminoácidos 159-411 representan el dominio de serina proteasa C-terminal catalíticamente activo o cadena B. El dominio de factor de crecimiento epidérmico es responsable de la unión de u-PA al receptor de u-PA anclado en la superficie celular (uPAR). En la matriz extracelular, u-PA se une a la membrana celular mediante la unión al receptor de u-PA. LMW-u-PA es proteolíticamente activo pero no se une al receptor de u-PA. El dominio de serina proteasa contiene bucles expuestos a la superficie alrededor de los residuos 37, 60, 96, 110, 170 y 185, mediante numeración de quimotripsinas. Tras la activación o escisión, el extremo amino se inserta en una hendidura de unión hidrófoba del dominio de proteasa catalítica que forma interacciones hidrófobas y un puente de sal hacia la cavidad lateral de Asp194 que estabiliza la cavidad de unión al sustrato y el orificio de oxianión en una conformación catalíticamente productiva. Asp194, de acuerdo con la numeración de quimotripsina, participa en la unión de hidrógeno al grupo amino de cadena principal de Gly142 y al grupo carbonilo de cadena principal de Lys143 (Bluuse *et al*. (2009) *J Biol Chem* 284:4647-4657). Los cambios conformacionales después de la escisión implican cuatro regiones desordenadas del dominio de activación, que incluyen el bucle de activación (residuos 16-21), el bucle de autólisis (residuos 142-152), el bucle estabilizador de oxianión (residuos 184-194) y el marco de entrada S1 (residuos 216-223), todos numerados de acuerdo con la numeración de quimotripsina (ver, Bluuse *et al*. (2009) *J Biol Chem* 284:4647-4657; Hedstrom (2002) *Chem Rev* 102:4501-4524; Huber and Bode (1978) *Acc Chem Res* 11:114-122; Madison *et al.* (1993) *Science* 262:419-421).

Los determinantes estructurales para u-PA se exponen en la Tabla 4 posterior con numeración basada en la numeración de quimotripsina madura. El número debajo de los encabezados de columna de bucle Cys168-Cys182 y 60 indica el número de aminoácidos en el bucle entre los dos aminoácidos y en el bucle. La designación de sí bajo los encabezados de columna Cys191-Cys220 indica que está presente un puente de disulfuro. Estas regiones

son variables dentro de la familia de serina proteasas similares a quimotripsina y representan determinantes estructurales en sí mismos. La modificación de un polipéptido de u-PA para alterar cualquiera o más de los aminoácidos en la cavidad S1-S4 afecta la especificidad o selectividad del polipéptido de u-PA para un sustrato diana. La especificidad de sustrato extendida (P1-P4) revela que u-PA tiene una alta especificidad para la escisión después de P1 Arg, una preferencia por aminoácidos pequeños en la posición P2, una preferencia por aminoácidos polares pequeños (Thr y Ser) en la posición P3 y ninguna preferencia en la posición P4 (Ke *et al*. (1997) *J. Biol. Chem*., 272:16603-16609; Harris *et al*. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:7754-7759).

Tabla 4. Determinantes estructurales para la escisión del sustrato de u-PA (numeración de quimotripsina)

Residuos que determinan la especificidad													
S4					**S3**		**S2**			**S1**			
171	**174**	**180**	**215**	**Cys168 Cys182**	**192**	**218**	**99**	**57**	**Bucle de 60**	**189**	**190**	**226**	**Cys191 Cys220**
H	S	M	W	15	Q	R	H	H	11	D	S	G	sí.

3. Función/actividad

El activador de plasminógeno tipo uroquinasa es una serina-proteasa que cataliza la hidrólisis de plasminógeno en plasmina. La plasmina actúa directamente sobre la degradación de proteínas de matriz extracelular (Andreasen *et al.* (2000) *Cell. Mol. Life Sci*. 57:25-40). u-PA juega un papel importante en la adhesión celular, migración e invasión, remodelación de tejidos y cáncer (Blasi *et al*. (2002) *Rev Mol Cell Biol* 3:932; Andreasen *et al.* (2000) *Cell. Mol. Life Sci*. 57:25-40; Mondino y Blasi (2004) *Trends Immunol* 25:450; Ploug (2003) *Curr Pharm Des* 9:1499). La expresión anormal de u-PA se ha asociado con artritis reumatoide, vasculitis alérgica, xeroderma pigmentosa y la capacidad invasiva de tumores malignos.

u-PA se regula por la unión al receptor de superficie celular de alta afinidad uPAR. La unión de u-PA a uPAR aumenta la velocidad de activación de plasminógeno y mejora la degradación de la matriz extracelular y la invasión celular. El complejo binario formado entre uPAR y u-PA interactúa con el plasminógeno asociado a membrana para formar complejos de activación de orden superior que reducen la Km (es decir, constante de velocidad cinética de la afinidad aproximada para un sustrato) para la activación de plasminógeno (Bass *et al*. (2002) *Biochem. Soc. Trans*., 30: 189-194). La unión de u-PA a uPAR protege la proteasa de la inhibición por el inhibidor cognado, es decir, PAI-1. Esto se debe a que el u-PA de cadena individual normalmente presente en plasma no es susceptible a la inhibición por PAI-1, y

cualquier u-PA activo en el plasma será inhibido por PAI-1. El u-PA activo que se une al receptor está completamente disponible para la inhibición por PAI-1, sin embargo, PAI-1 no puede acceder a la molécula activa unida (Bass *et al*. (2002) *Biochem. Soc. Trans*., 30: 189-194). Como resultado, u-PA funciona principalmente en la superficie celular y sus funciones se correlacionan con la activación de proteólisis pericelular dependiente de plasmina.

u-PA también escinde el factor de crecimiento/factor de dispersión de hepatocitos (HGF/SF), la forma latente de metaloproteasa de matriz de membrana tipo 1 (MT-SP1; matriptasa), factor de crecimiento derivado de plaquetas C (PDGF-C), factor de crecimiento derivado de plaquetas D (PDGF-D), factor de crecimiento derivado de plaquetas DD (PDGF-DD) y otras proteínas (ver, *por* ejemplo, Hurst *et al*. (2012) *Biochem J* 441:909-918; Ustach and Kim (2005) *Mol Cell Biol* 5:6279-6288; Ehnman *et al.* (2009) *Oncogene* 28(4):534-544). La plasmina degrada los coágulos de fibrina, escinde la fibrina, fibronectina, tromboespondina, laminina y factor de von Willebrand, proteoliza los mediadores del sistema de complemento y activa las colagenasas. Como tal, la plasmina participa en la trombólisis o degradación de la matriz extracelular, uniéndose a la plasmina a enfermedades vasculares y cáncer. Por ejemplo, se ha observado que los componentes del sistema de activación de plasminógeno se expresan altamente en tumores malignos. El factor de crecimiento/dispersión de hepatocitos regula el crecimiento celular, motilidad celular y morfogénesis mediante la unión del HGF activado al receptor de HGF c-Met y su capacidad para estimular la mitogénesis, la motilidad celular y la invasión de matriz lo vinculan a la angiogénesis, tumorogénesis y regeneración tisular. Los factores de crecimiento derivados de plaquetas regulan el crecimiento y división celular y desempeñan un papel significativo en la angiogénesis, que, cuando no se controla, es una característica del cáncer. Una vez activados por escisión proteolítica, los PDGF se unen a las tirosina cinasas receptoras de PGDF que conducen a la fosforilación y una serie de vías de señalización aguas abajo involucradas en el cáncer. Debido al papel de u-PA y las proteínas mencionadas anteriormente en enfermedades vasculares, los polipéptidos de u-PA proporcionados en la presente se alteran de manera que reducen la selectividad hacia estas proteínas. En virtud de los cambios en su especificidad y actividad, los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente exhiben actividad reducida o ninguna actividad sustancial en sustratos naturales, y alta actividad, en comparación con u-PA no modificado en la proteína C3 de complemento. Como resultado, a dosis terapéuticas, los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente inhiben específicamente la activación del complemento pero no tienen ninguno o pocos efectos secundarios de la escisión de las dianas naturales de u-PA.

C. INHIBICIÓN DE COMPLEMENTO MEDIANTE EL DIRECCIONAMIENTO HACIA

C3

Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente exhiben mayor especificidad y/o actividad para una secuencia de escisión inhibitoria en la proteína C3 de complemento n comparación con u-PA que no contiene las modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, u-PA humano tipo silvestre (ver SEQ ID NO:1 o 3)) o el dominio catalítico o dominio proteasa del mismo (véase SEQ ID NO:2) o polipéptidos de u-PA no modificados correspondientes que incluyen el reemplazo C122S, por numeración de quimotripsina. El reemplazo con S en el residuo 122 no altera la especificidad o actividad en C3, pero reduce la agregación. Dado que C3 está involucrado en las 3 vías de inicio del complemento (ver, por ejemplo, FIGURA 1), dirigirse a C3 por inhibición proteolítica proporciona una diana terapéutica general y amplia para la inactivación de la cascada del complemento. La escisión por inactivación de C3 bloquea la actividad terminal del complemento, así como el bucle de amplificación de la vía alternativa. Las tres vías convergen en C3 (ver, por ejemplo, Figura 1). En virtud de la capacidad de inhibir la activación del complemento, estos polipéptidos de u-PA modificados se pueden utilizar para tratar varias enfermedades, condiciones y patologías asociadas con la activación del complemento, tal como respuestas inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias. La activación del complemento se asocia con el desarrollo de enfermedades y condiciones al promover la inflamación local y el daño a tejidos provocado en parte por la generación de moléculas efectoras y un complejo de ataque de membrana. En un ejemplo, tal como en muchas enfermedades autoinmunes, el complemento produce daño tisular porque se activa bajo circunstancias inapropiadas, tal como por anticuerpo a tejidos hospedadores. En otras situaciones, el complemento se puede activar normalmente, tal como por septicemia, pero aún contribuye a la progresión de la enfermedad, tal como en el síndrome de dificultad respiratoria. Patológicamente, el complemento puede provocar daños sustanciales a los vasos sanguíneos (vasculitis), membrana basal renal y células endoteliales y epiteliales unidas (nefritis), sinovio articular (artritis) y eritrocitos (hemólisis) si no se controlan adecuadamente. El papel de C3 en la activación del complemento se analiza con más detalle posteriormente.

1. Proteína C3 de complemento y su papel en la iniciación de complemento

El sistema de complemento implica más de 30 proteínas solubles y unidas a la membrana celular que funcionan no solo en la respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos, sino también en la respuesta inmunitaria innata para reconocer y destruir patógenos tal como bacterias, células infectadas por virus y parásitos. La activación del complemento se inicia en las superficies patógenas a través de tres vías distintas: la vía clásica, la vía alternativa y la vía de lectina. Estas vías son distintas ya que los componentes necesarios para su iniciación

son diferentes, pero las vías en última instancia generan el mismo conjunto de moléculas efectoras (por ejemplo, C3-convertasas) que escinden la proteína C3 de complemento para desencadenar la formación del complejo de ataque de membrana (MAC) (ver, por ejemplo, Figura 1). De esta manera, la proteína C3 de complemento es una diana atractiva para un agente terapéutico ya que la modulación de C3 da como resultado la modulación de varias opsoninas, anafilatoxinas y el MAC. Adicionalmente, las proteínas inhibidoras de complemento de origen natural que incluyen el factor H (FH), CR1, Ig del receptor del complemento (CR1g), DAF y MCP inhiben a nivel de C3. Hay tres (3) vías de activación del complemento (ver Figura 1, que ilustra estas vías). Las vías de complemento son distintas; cada una depende de diferentes moléculas y mecanismos para la iniciación. Las vías son similares ya que convergen para generar el mismo conjunto de moléculas efectoras, es decir, C3-convertasas. En las vías clásica y de lectina C4b2b actúa como una C3-convertasa; en la vía alternativa, C3bBb es una C3-convertasa (ver Tabla 5). La escisión de C3 genera C3b, que actúa como una opsonina y como la principal molécula efectora del sistema de complemento para reacciones posteriores de complemento, y C3a, que es un mediador peptídico de la inflamación. La adición de C3b a cada C3-convertasa forma una C5-convertasa que genera C5a y C5b. C5a, como C3a, es un mediador peptídico de la inflamación. C5b media los eventos “tardíos” de activación del complemento iniciando la secuencia de reacciones que culminan en la generación del complejo de ataque de membrana (MAC). Aunque las tres vías producen diferentes C3 y C5-conversasas, todas las vías producen los productos divididos de C3 y C5 y forman MAC. De manera alternativa, C3 se puede escindir y activar mediante proteasas extrínsecas, tal como enzimas lisosomales y elastasa (Markiewski y Lambris (2007) *Am J Pathology* 171:715-727; Ricklin y Lambris (2007) *Nat Biotechnol* 25:1265-1275).

Tabla 5. Cascadas de complemento

	Vía alternativa	**Vía clásica**	**Vía de Lectina**
Activadores	Moléculas superficiales de patógeno LPS, ácido teicoico, zimosán	IgM e IgG unidas a antígeno; moléculas no inmunitarias	Patógenos por reconocimiento de carbohidratos en superficie
C3 convertasa	C3bBb	C4b2b	C4b2b
C5 convertasa	C3bBb3b	C4b2b3b	C4b2b3b
MAC	C5678poly9	C5678poly9	C5678poly9
anafilatoxinas	C3a, C5a	C3a, C4a, C5a	C3a, C4a, C5a

a. Vía clásica

C1q es el primer componente de la vía clásica de complemento. C1q es una

proteína de unión dependiente de calcio asociada con la familia de proteínas colectoras debido a una homología estructural compartida general (Malhotra *et al*., (1994) *Clin Exp Immunol*. 97(2):4-9; Holmskov *et al*. (1994) *Immunol Today* 15(2):67-74). Las colecciones, frecuentemente llamadas moléculas de reconocimiento de patrones, en general funcionan como opsoninas para dirigirse a patógenos para la fagocitosis por las células inmunitarias. A diferencia de las colecciones convencionales, tal como MBL, el dominio de reconocimiento globular carboxi-terminal de C1q no tiene actividad de lectina pero puede servir como una molécula de reconocimiento de patrón “cargada” debido a marcadas diferencias en el potencial de superficie electrostática de sus dominios globulares (Gaboriaud *et al*. (2003) *J. Biol. Chem*. 278(47):46974-46982).

C1q inicia la vía clásica de complemento de dos maneras diferentes. En primer lugar, la vía clásica se activa mediante la interacción de C1q con complejos inmunitarios (es decir, complejos antígeno-anticuerpo o anticuerpo IgG o IgM agregado), uniendo así la respuesta inmunitaria humoral mediada por anticuerpos con la activación del complemento. Cuando la parte Fab (la región variable) de IgM o IgG se une al antígeno, se altera la conformación de la región Fc (constante), lo que permite que C1q se una. C1q se debe unir al menos a 2 regiones Fc para ser activadas. C1q, sin embargo, también es capaz de activar el complemento en ausencia de anticuerpo, funcionando de esta manera en la respuesta inmunitaria innata o inmediata a la infección. Además de la iniciación por un anticuerpo, la activación del complemento también se logra mediante la interacción de C1q con moléculas no inmunitarias tal como polianiones (lipopolisacáridos bacterianos, ADN y ARN), ciertos polisacáridos pequeños, membranas virales, proteína C reactiva (CRP), componente P amiloide sérico (SAP) y componentes de membrana bacteriana, fúngica y viral.

C1q es parte del complejo C1 que contiene una molécula C1q individual unida a dos moléculas cada una de los zimógenos C1r y C1s. La unión de más de uno de los dominios globulares C1q a una superficie diana (tal como anticuerpo agregado o un patógeno), provoca un cambio conformacional en el complejo $(C1r:C1s)_2$ que da como resultado la activación de proteasa C1r para escindir C1s para generar una serina proteasa activa. El C1s activo escinde los componentes posteriores de complemento C4 y C2 para generar C4b y C2b, que conjuntamente forman la C3-convertasa de la vía clásica. La C3-convertasa escinde C3 en C3b, que se une covalentemente a la superficie del patógeno y actúa como una opsonina, y C3a, que estimula la inflamación. Algunas moléculas C3b se asocian con complejos C4b2b que producen C4b2b3b que es la C5-convertasa en cascada clásica. La Tabla 6 resume las proteínas involucradas en la vía clásica del complemento.

Tabla 6. Proteínas de la Vía Clásica		
Componente nativo	**Forma activa**	**Función de la Forma Activa**
C1 (C1q:(C1r:C1s)$_2$)	C1q	Se une directamente a superficies patógenas o indirectamente al anticuerpo unido a patógenos
	C1r	Escinde C1s en una proteasa activa
	C1s	Escinde C4 y C2
C4	C4b	Se une al patógeno y actúa como una opsonina; se une a C2 para la escisión por C1s
	C4a	Mediador peptídico de inflamación
C2	C2b	Enzima activa de la vía clásica C3/C5-convertasa; escinde C3 y C5
	C2a	Precursor de la quinina C2 vasoactiva
C3	C3b	Se une a superficies de patógeno y actúa como una opsonina; inicia la amplificación a través de la vía alternativa; se une a C5 para la escisión por C2b
	C3a	Mediador peptídico de inflamación

b. Vía alternativa

La vía alternativa se inicia por patógenos extraños en ausencia de anticuerpo. La iniciación del complemento por la vía alternativa se presenta a través de la hidrólisis espontánea de C3 en C3b. Una pequeña cantidad de C3b siempre está presente en los fluidos corporales, debido a la actividad de la proteasa en suero y tejido. Las autocélulas hospedadoras normalmente contienen altos niveles de ácido siálico de membrana que inactivan C3b si se une, pero las bacterias contienen bajos niveles de ácido siálico externo y, por lo tanto, se unen a C3b sin inactivarlo. C3b en las superficies patógenas es reconocido por la proteasa de zimógeno Factor B. El Factor B se escinde por el Factor D. El Factor D es la única proteasa activadora del sistema de complemento que circula como una enzima activa en lugar de como un zimógeno, pero ya que el Factor B es el único sustrato para el Factor D, la presencia de niveles bajos de una proteasa activa en suero normal es en general seguro para el hospedador. La escisión del Factor B por el Factor D produce el producto activo Bb que se puede asociar con C3b para formar C3bBb, la C3-convertasa de la vía alternativa. Similar a la vía clásica, la C3-convertasa produce más C3b y C3a a partir de C3. C3b se une covalentemente a la superficie de patógeno y actúa como una opsonina e inicia adicionalmente la vía alternativa, mientras que C3a estimula la inflamación. Algo de C3b se une al complejo para formar C3bBb3b, la C5-convertasa de la vía alternativa. C3bBb3b se estabiliza mediante la proteína plasmática properdina o Factor P que se une a las superficies microbianas y estabiliza la convertasa. La Tabla 7 resume las proteínas involucradas en la vía alternativa del complemento.

Tabla 7. Proteínas de la Vía Alternativa		
Componente nativo	**Forma activa**	**Función de la Forma Activa**
C3	C3b	Se une a la superficie del patógeno, se une al Factor B para la escisión por el Factor D
Factor B	Ba	Fragmento pequeño de factor B, función desconocida
	Bb	Enzima activa de la C3-convertasa y C5-convertasa
Factor D	D	Serina proteasa plasmática, escinde el Factor B cuando se une a C3b a Ba y Bb
Factor P (properdina)	P	Proteínas plasmáticas con afinidad por la C3bBb-convertasa en células bacterianas; estabiliza la convertasa

c. Vía de Lectina

La vía de lectina (también denominada vía MBL) se inicia después del reconocimiento y unión de patrones moleculares asociados con patógenos (PAMP; es decir, porciones de carbohidratos) por proteínas de lectina. Los ejemplos de proteínas de lectina que activan la vía de lectina del complemento incluyen lectina de unión a manosa (MBL) y ficolinas (es decir, L-ficolina, M-ficolina y H-ficolina). MBL es un miembro de la familia de proteínas de la colectina y, por lo tanto, existe como un oligómero de subunidades compuestas de cadenas de polipéptidos idénticas, cada una de las cuales contiene un dominio de lectina o reconocimiento de carbohidratos, similar a colágeno, rico en cisteína. MBL actúa como una molécula de reconocimiento de patrón para reconocer porciones de carbohidratos, particularmente azúcares neutros tal como manosa o N-acetilglucosamina (GlcNAc) en la superficie de patógenos a través de su dominio de lectina globular de una manera dependiente del calcio. MBL también actúa como una opsonina para facilitar la fagocitosis de patógenos bacterianos, virales y fúngicos por células fagocíticas. Los iniciadores adicionales de la vía de lectina incluyen ficolinas incluidas L-ficolina, M-ficolina y H-ficolina (ver, por ejemplo, Liu *et al*. (2005) *J Immunol.* 175:3150-3156). De manera similar a MBL, las ficolinas reconocen porciones de carbohidrato tal como, por ejemplo, N-acetil glucosamina y estructuras de manosa.

La activación de la vía alternativa por MBL o ficolinas es análoga a la activación de la vía clásica por C1q mediante la cual una molécula individual de lectina interactúa con dos cimógenos de proteasa. En el caso de las proteínas de lectina, los zimógenos son serina proteasas asociadas a MBL, MASP-1 y MASP-2, que son estrechamente homólogos a los zimógenos C1r y C1s de la vía clásica. Tras el reconocimiento de un PAMP por una proteína de lectina, tal como, por ejemplo, mediante la unión a una superficie de patógeno, MASP-1 y MASP-2 se activan para escindir C4 y C2 para formar la C3-convertasa de la cascada de MBL. C3b luego se une al complejo para formar la C5-convertasa de la cascada de MBL. La

activación de MASP está implicada no solo en las respuestas a microorganismos, sino en cualquier respuesta que implique exponer azúcares neutros, incluyendo pero no limitado a lesión tisular, tal como la observada en trasplantes de órganos. Al igual que la cascada alternativa, la cascada de MBL se activa independientemente del anticuerpo; al igual que la cascada clásica**,** la cascada de MBL utiliza C4 y C2 para formar la C3-convertasa. La Tabla 8 resume las proteínas involucradas en la vía de lectina del complemento.

Tabla 8. Proteínas de la Vía de Lectina

Componente nativo	**Forma activa**	**Función de la Forma Activa**
MBL	MBL	Reconoce PAMP, tal como en superficies patógenas (por ejemplo, a través del reconocimiento de carbohidratos)
Ficolinas	L-Ficolina; M-Ficolina, o H-Ficolina	Reconoce PAMP, tal como en superficies patógenas (por ejemplo, a través del reconocimiento de carbohidratos)
MASP-1	MASP-1	Escinde C4 y C2
MASP-2	MASP-2	Escinde C4 y C2

d. Funciones efectoras mediadas por complemento

A pesar de la vía de iniciación que se utilice, el resultado final es la formación de fragmentos activados de proteínas de complemento (por ejemplo, anafilatoxinas C3a, C4a y C5a y complejos de ataque de membrana C5-9), que actúan como moléculas efectoras para mediar diversas funciones efectoras. El reconocimiento de las moléculas efectoras de complemento por las células para el inicio de las funciones efectoras (por ejemplo, quimiotaxis y opsonización) se medía por un grupo diverso de receptores de complemento. Los receptores de complemento se distribuyen en una amplia variedad de tipos de células incluidos eritrocitos, macrófagos, células B, neutrófilos y células cebadas. Tras la unión de un componente de complemento al receptor, los receptores inician una cascada de señalización intracelular que da como resultado respuestas celulares tal como estimular la fagocitosis de bacterias y secretar moléculas inflamatorias de la célula. Por ejemplo, los receptores de complemento CR1 y CR2 que reconocen C3b, C4b y sus productos son importantes para estimular la quimiotaxis. CR3 (CD11b/CD18) y CR4 (CD11c/CD18) son integrinas que son igualmente importantes en las respuestas fagocíticas, pero también juegan un papel en la adhesión y migración de leucocitos en respuesta a iC3b. Los receptores C5a y C3a son receptores acoplados a proteína G que desempeñan un papel en muchas de las funciones proinflamatorias mediadas por las anafilatoxinas C5a y C3a. Por ejemplo, los receptores para C3a, C3aR, existen en células cebadas, eosinófilos, neutrófilos, basófilos y monocitos y están directamente involucrados en los efectos proinflamatorios de C3a.

De esta manera, a través de receptores de complemento, estos fragmentos de molécula efectora de complemento median varias funciones incluidas quimiotaxis de leucocitos, activación de macrófagos, permeabilidad vascular y lisis celular (Frank, M. y Fries, L. Complemento. In Paul, W. (ed.) Fundamental Immunology, Raven Press, 1989). Un resumen de algunas funciones efectoras de productos de complemento se listan en la tabla 9.

Tabla 9: Moléculas y Funciones del Efector del Complemento

Producto	**Actividad**
C2b (procinina)	acumulación de líquido corporal
C3a (anafilatoxina)	Desgranulación de basófilos y células cebadas; permeabilidad vascular mejorada; contracción del músculo liso; inducción de célula T supresoras
C3b y sus productos	opsonización; activación de fagocitos
C4a (anafilatoxina)	activación de basófilos y células cebadas; contracción del músculo liso; permeabilidad vascular mejorada
C4b	opsonización
C5a (anafilatoxina; factor quimiotáctico)	activación de basófilos y células cebadas; permeabilidad vascular mejorada; contracción del músculo liso; quimiotaxis; agregación de neutrófilos; estimulación del metabolismo oxidativo; estimulación de la liberación de leucotrieno; inducción de linfocitos T auxiliares
C5b67	quimiotaxis; unión a otras membranas celulares y lisis de células transeúntes
C5b6789 (C5b-9)	lisis de células diana

i. Lisis mediada por complemento: Complejo de Ataque de Membrana

El paso final de la cascada de complemento por las tres vías es la formación del complejo de ataque de membrana (MAC) (Figura 1). C5 se puede escindir mediante cualquier C5-convertasa en C5a y C5b. C5b se combina con C6 y C7 en solución, y el complejo C5b67 se asocia con la membrana lipídica patógena mediante sitios hidrófobos en C7. C8 y varias moléculas de C9, que también tienen sitios hidrófobos, se unen para formar el complejo de ataque de membrana, también llamado C5b6789 o C5b-9. C5b-9 forma un poro en la membrana a través del cual pueden pasar agua y solutos, lo que da como resultado lisis osmótica y muerte celular. Si el complemento se activa en un antígeno sin una membrana lipídica a la que se puede unir el C5b67, el complejo C5b67 se puede unir a células cercanas e iniciar la lisis de transeúntes. Un MAC iindividual puede lisar un eritrocito, pero las células nucleadas pueden endocitar MAC y reparar el daño a menos que haya múltiples MAC presentes. Las bacterias gramnegativas, con su membrana externa expuesta y virus envueltos, son en general susceptibles a la lisis mediada por complemento. Menos susceptibles son las bacterias Gram positivas, cuya membrana plasmática está protegida por su gruesa capa de peptidoglicano, bacterias con una cápsula o capa de limo alrededor de su

pared celular, o virus que no tienen envoltura lipídica. Asimismo, el MAC se puede interrumpir mediante proteínas que se unen al complejo antes de la inserción de membrana, tal como inhibidor estreptocócico del complemento (SIC) y clusterina. Habitualmente, el MAC ayuda a destruir bacterias gramnegativas, así como células humanas que muestran antígenos extraños (células infectadas por virus, células tumorales, etc.) al provocar su lisis y también puede dañar la envoltura de virus envueltos.

ii. Inflamación

La inflamación es un proceso en el que los vasos sanguíneos se dilatan y se vuelven más permeables, permitiendo así que las células de defensa corporal y los productos químicos de defensa salgan de la sangre y entren en los tejidos. La activación del complemento da como resultado la formación de varios mediadores proinflamatorios tal como C3a, C4a y C5a. Las anafilatoxinas intactas en suero o plasma se convierten rápidamente en las formas C3a-desArg, C4a-desArg o C5a-desArg más estables y menos activas, mediante carboxipeptidasa N. C3a, C4a y C5a, y en menor medida sus derivados de desArg, son polipéptidos bioactivos potentes, denominados anafilatoxinas debido a su actividad inflamatoria. Las anafilatoxinas se unen a receptores en varios tipos de células para estimular la contracción del músculo liso, aumentar la permeabilidad vascular y activar las células cebadas para liberar mediadores inflamatorios. C5a, la anafilatoxina más potente, actúa principalmente sobre los glóbulos blancos, particularmente los neutrófilos. C5a estimula la adherencia de leucocitos a las paredes de los vasos sanguíneos en el sitio de infección al estimular la expresión aumentada de moléculas de adhesión para que los leucocitos puedan exprimirse fuera de los vasos sanguíneos y hacia los tejidos, un proceso denominado diapedesis. C5a también estimula a los neutrófilos a producir especies reactivas de oxígeno para la destrucción extracelular, enzimas proteolíticas y leucotrienos. C5a también puede amplificar adicionalmente el proceso inflamatorio indirectamente al inducir la producción de quimiocinas, citocinas y otros mediadores proinflamatorios. C5a también interactúa con las células cebadas para liberar vasodilatadores tal como histamina para que los vasos sanguíneos se vuelvan más permeables. C3a también interactúa con los glóbulos blancos, con efectos importantes sobre los eosinófilos que sugieren un papel de C3a en la inflamación alérgica. C3a induce la contracción del músculo liso, mejora la permeabilidad vascular y provoca desgranulación de basófilos y liberación de histamina y otras sustancias vasoactivas. C2a se puede convertir en quinina C2, que regula la presión arterial haciendo que los vasos sanguíneos se dilaten.

Aunque técnicamente no se considera una anafilatoxina, iC3b, un derivado inactivo de C3b, funciona para inducir la adhesión de leucocitos al endotelio vascular e inducir la

producción de la citocina proinflamatoria IL-1 a través de la unión a sus receptores de integrina de superficie celular. C5b-9 también estimula indirectamente la adhesión, activación y quimiotaxis de leucocitos al inducir la expresión de moléculas de adhesión celular tal como E-selectina e inducir la secreción de interleucina-8 (Bhole *et al*. (2003) *Crit Care Med* 31(1):97-104). C5b-9 también estimula la liberación de mediadores secundarios que contribuyen a la inflamación, tal como, por ejemplo, prostaglandina E_2, leucotrieno B_4 y tromboxano.

La conversión de los componentes de complemento humano C3 y C5 para producir sus respectivos productos de anafilatoxina se ha implicado en ciertos estados patológicos de origen natural incluidos: trastornos autoinmunitarios tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, malignidad, infarto de miocardio, retinopatía de Purtscher, sepsis y síndrome de dificultad respiratoria en adultos. Se han detectado niveles circulantes aumentados de C3a y C5a en ciertas condiciones asociadas con la activación del complemento iatrogénico, tal como: cirugía de derivación cardiopulmonar, diálisis renal y leucemia de fibra de nailon.

iii. Quimiotaxis

La quimiotaxis es un proceso mediante el cual las células se dirigen a migrar en respuesta a los productos químicos en su entorno. En la respuesta inmunitaria, una variedad de quimiocinas dirigen el movimiento de células, tal como células fagocíticas, a sitios de infección. Por ejemplo, C5a es el principal factor quimiotáctico para los neutrófilos circulantes, pero también puede inducir quimiotaxis de monocitos. Los fagocitos se mueven hacia concentraciones crecientes de C5a y posteriormente se unen, a través de sus receptores CR1, a las moléculas de C3b unidas al antígeno. El efecto quimiotáctico de C5a, observado con basófilos, eosinófilos, neutrófilos y fagocitos mononucleares, es activo en concentraciones tan bajas como 10^{-10} M.

iv. Opsonización

Una acción importante del complemento es facilitar la absorción y destrucción de patógenos por las células fagocíticas. Esto se presenta mediante un proceso denominado opsonización mediante el cual los componentes del complemento unidos a bacterias diana interactúan con receptores del complemento en la superficie de células fagocíticas tales como neutrófilos o macrófagos. En este caso, las moléculas efectoras de complemento se denominan opsoninas. La opsonización de patógenos es una función principal de C3b y C4b. iC3b también funciona como una opsonina. C3a y C5a aumentan la expresión de receptores C3b en fagocitos y aumentan su actividad metabólica.

C3b y, en menor medida, C4b ayudan a eliminar los complejos inmunitarios dañinos del cuerpo. C3b y C4b unen los complejos inmunitarios a los receptores CR1 en los

eritrocitos. Los eritrocitos luego administran los complejos a macrófagos fijos dentro del bazo y el hígado para su destrucción. Los complejos inmunitarios pueden conducir a una hipersensibilidad Tipo III dañina.

v. Activación de la Respuesta Inmunitaria Humoral

La activación de células B requiere ligadura del receptor de células B (BCR) por antígeno. Se ha demostrado, sin embargo, que el complemento juega un papel en la reducción del umbral de respuestas de células B al antígeno hasta 1000 veces. Esto se presenta por la unión de C3d o C3dg, productos complementarios generados a partir de los fragmentos de descomposición de C3, a receptores CR2 en linfocitos B que pueden co-ligarse con el BCR. La corregulación co-ligadura se presenta cuando las partículas antigénicas, tal como, por ejemplo, complejos inmunitarios, opsonizados con C3d se unen al receptor CR2 a través de C3d, así como al BCR a través del antígeno. La co-ligadura de complejos de antígeno también puede presentarse cuando C3d se une a antígenos que mejoran su absorción por células presentadoras de antígeno, tal como células dendríticas, que luego pueden presentar el antígeno a células B para mejorar la respuesta de anticuerpo. Los ratones deficientes en CR2 muestran defectos en la función de células B que dan como resultado niveles reducidos de anticuerpo natural y respuestas inmunitarias humorales deterioradas.

2. Estructura y Función de C3

Los polipéptidos de u-PA variantes proporcionados en la presente escinden la proteína C3 de complemento o sus fragmentos proteolíticos inhibiendo de esta manera el complemento. La proteína C3 de complemento humano (número de acceso Uniprot P01024) es una pre-proproteína de cadena simple de 1663 aminoácidos que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:47. La proteína está codificada por un gen de 41 kb ubicado en el cromosoma 19 (secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:46). La pre-proproteína contiene un péptido señal de 22 aminoácidos (aminoácidos 1-22 de SEQ ID NO:47) y una secuencia de tetra-arginina (aminoácidos 678-681 de SEQ ID NO:47) que se elimina mediante una enzima similar a furina que resulta en la formación de una proteína de dos cadenas madura que contiene una cadena beta (aminoácidos 23-667 de SEQ ID NO:47) y una cadena alfa (aminoácidos 672-1663 de SEQ ID NO:47), que están unidas por un enlace de disulfuro intercadena entre los residuos de aminoácidos Cys559 y Cys816. La proteína de 2 cadenas madura tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:77.

Durante la cascada del complemento, la proteína C3 de complemento se procesa adicionalmente mediante escisión proteolítica para formar varios fragmentos proteolíticos de C3. Como se describió anteriormente, las tres vías de inicio de complemento convergen en las convertasas C4b2b y C3bBb de C3. Las C3-convertasas escinden C3 entre los residuos

748 y 749 de SEQ ID NO:47 (ver Tabla 10 a continuación) generando la anafilatoxina C3a (aminoácidos 672-748 de SEQ ID NO:47) y la opsonina C3b (cadena C3b alfa'; aminoácidos 749-1663 de SEQ ID NO:47). C3a está involucrada en la inflamación y C3b forma las C5-convertasas que finalmente conducen a la anafilatoxina C5a y el MAC. Los polipéptidos de u-PA variantes proporcionados en la presente inhiben el complemento y, como tales, no escinden C3 en este sitio de escisión GLAR.

C3b tiene sitios de unión para varios componentes de complemento que incluyen C5, properdina (P), factores H, B e I, receptor 1 de complemento (CR1) y la proteína de cofactor de membrana (MCP) (ver Sahu y Lambris (2001) *Immunological Reviews* 180:35-48). La unión del Factor I, una proteasa plasmática, en presencia de cofactores H, CR1 y MCP da como resultado la inactivación de C3b, mientras que la unión de los factores B y P en presencia del factor D da como resultado la amplificación de la convertasa C3 y el inicio de MAC. El factor I escinde C3b en presencia de cofactores entre los residuos 1303-1304, 1320-1321 y 954-955 de la SEQ ID NO:47 (ver Tabla 10 a continuación) generando fragmentos iC3b (aminoácidos 749-1303 de la SEQ ID NO:47) y C3f (aminoácidos 1304-1320 de la SEQ ID NO:47). Subsiguientemente, el Factor I escinde iC3b generando C3c (Fragmento 1 de cadena alfa'de C3c; aminoácidos 749-954 de SEQ ID NO:47) y C3dg (aminoácidos 955-1303 de SEQ ID NO:47). El resultado final es que C3b se inactiva permanentemente (ver Sahu y Lambris (2001) *Immunological Reviews* 180:35-48). Dado que el Factor I inactiva C3b, los sitios de escisión del Factor I son candidatos para la escisión por los polipéptidos de u-PA variantes proporcionados en la presente. Los fragmentos proteolíticos de C3b adicionales incluyen C3g (aminoácidos 955-1001 de SEQ ID NO:47), C3d (aminoácidos 1002-1303 de SEQ ID NO:47) y Fragmento 2 de cadena alfa' C3c (aminoácidos 1321-1663 de SEQ ID NO:47). Las secuencias de escisión en la proteína C3 del complemento se exponen en la Tabla 10 posterior, que enumera los residuos P4-P1, los residuos de aminoácidos del sitio de escisión (sitio P1-P1') y la proteasa responsable de la escisión. Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente no se escinden en estos sitios.

TABLA 10: Secuencias de Escisión de Proteína C3 de complemento

Residuos P4-P1	Sitio de escisión (en SEQ ID NO:47) Entre residuos	Proteasa	SEQ ID NO.
GLAR	748-749	C3 convertasa	78
RLGR	954-955	Factor I	79
LPSR	1303-1304	Factor I	80
SLLR	1320-1321	Factor I	81

a. C3a

C3a (aminoácidos 672-748 de SEQ ID NO:47) es una anafilatoxina que está involucrada en inflamación, desgranulación de basófilos y células cebadas, permeabilidad vascular mejorada, contracción de músculo liso e inducción de células T supresoras.

b. C3b

C3b (aminoácidos 749-1663 de SEQ ID NO:47) tiene varias funciones en la cascada de complemento. C3b es una opsonina que facilita la absorción y destrucción de patógenos por células fagocíticas. Adicionalmente, C3b se combina con las C3-convertasas para generar las C5-convertasas que activan la proteína C5 de complemento, generando de esta manera la anafilatoxina C5a y C5b, que se combina con C6, C7, C8 y C9 para formar el complejo de ataque de membrana. Adicionalmente, como se describe en la sección 1b anterior, C3b está involucrado en la vía alternativa de inicio de complemento. C3b se regula por la proteína reguladora de complemento Factor I, una proteasa plasmática que degrada C3b en varios fragmentos, incluidos iC3b, C3c, C3d, C3f y C3dg, inactivando de esta manera permanentemente C3b.

C3b juega un papel crítico en las funciones efectoras mediadas por complemento en virtud de su capacidad de unirse a las C3-convertasas C4b2b y C3bBb, generando de esta manera las C5-convertasas C4b2b3b y C3bBb3b. Las C5-convertasas escinden el zimógeno C5 en sus fragmentos activos, a saber, la anafilatoxina C5a y C5b. C5a está involucrado en quimiotaxis e inflamación y C5b está involucrado en la formación de MAC.

c. Inhibidores de C3b

C3b tiene sitios de unión para varios componentes de complemento que incluyen C5, properdina (P), factores H, B e I, receptor 1 de complemento (CR1) y la proteína de cofactor de membrana (MCP) (ver Sahu y Lambris (2001) *Immunological Reviews* 180:35-48). La unión del Factor I, una proteasa plasmática, en presencia de cofactores H, CR1 y MCP da como resultado la inactivación de C3b, mientras que la unión de los factores B y P en presencia del factor D da como resultado la amplificación de la convertasa C3 y el inicio de MAC. El factor I escinde C3b en presencia de cofactores entre los residuos 1303-1304, 1320-1321 y 954-955 de la SEQ ID NO:47 generando fragmentos iC3b (aminoácidos 749-1303 de la SEQ ID NO:47) y C3f (aminoácidos 1304-1320 de la SEQ ID NO:47). Aunque técnicamente no se considera una anafilatoxina, iC3b, un derivado inactivo de C3b, funciona para inducir la adhesión de leucocitos al endotelio vascular e inducir la producción de la citocina proinflamatoria IL-1 a través de la unión a sus receptores de integrina de superficie celular. La proteína iC3b funciona como una opsonina. Posteriormente, el Factor I escinde fragmentos, generadores de iC3b, C3c (Fragmento 1 de cadena C3c alfa': aminoácidos 749-954 de SEQ ID NO:47 y Fragmento 2 de cadena C3c alfa': aminoácidos 1321-1663 de SEQ ID NO:47) y

C3dg (aminoácidos 955-1303 de SEQ ID NO:47). El resultado final es que C3b se inactiva permanentemente (ver Sahu y Lambris (2001) *Immunological Reviews* 180:35-48). C3dg se puede escindir adicionalmente para generar fragmentos C3g (aminoácidos 955-1001 de SEQ ID NO: 47) y C3d (aminoácidos 1002-1303 de SEQ ID NO:47).

D. POLIPÉPTIDOS DE U-PA MODIFICADOS QUE ESCINDEN C3

En la presente se proporcionan polipéptidos de activador de plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA) modificados o variantes. También se proporcionan conjugados, tal como proteínas de fusión, que contienen polipéptidos de u-PA modificados, de modo que las formas activadas resultantes de estos escindan C3. Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente exhiben actividades o propiedades alteradas en comparación con un polipéptido de u-PA natural, tipo silvestre o de referencia. Por ejemplo, los polipéptidos de u-PA proporcionados en la presente contienen modificaciones en comparación con un polipéptido de u-PA natural, tipo silvestre o de referencia expuesto en cualquiera de SEQ ID NO:1-6, o en un polipéptido que tiene al menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%, particularmente al menos 95% de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:1-6, tal como el dominio de proteasa de u-PA de referencia expuesto en SEQ ID NO:5. Entre los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente se incluyen polipéptidos de u-PA que alteran (inhiben) la activación del complemento al efectuar la escisión inhibitoria de la proteína C3 de complemento. Entre los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente se encuentran aquellos que efectúan la escisión inhibitoria de la proteína C3 de complemento. Se incluyen aquellos que efectúan escisión inhibitoria de C3 con mayor actividad o especificidad, K_{cat}/K_m, en comparación con una forma correspondiente de u-PA que no contiene la modificación (el reemplazo, deleción y/o inserción) o en comparación con la forma correspondiente de u-PA no modificado cuyas secuencias se exponen en cualquiera de SEQ ID NO:1-6. Los polipéptidos de u-PA modificados también pueden tener especificidad y/o selectividad disminuidas para sustratos y dianas escindidas o reconocidas por u-PA no modificado, que incluyen escisión de plasminógeno y/o unión a uPAR, en comparación con el polipéptido de u-PA correspondiente que no contiene las modificaciones de aminoácidos.

Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente inhiben o inactivan el complemento a través de la escisión inhibidora o inactivadora de la proteína C3 de complemento. Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente inhiben o inactivan el complemento al escindir la proteína C3 de complemento en un sitio de escisión que da como resultado la inhibición o inactivación de C3. La inactivación o escisión por inhibición de la proteína C3 de complemento puede estar en cualquier secuencia en C3

siempre que la escisión resultante de C3 dé como resultado la inactivación o inhibición de la activación del complemento. Dado que los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente inhiben la activación del complemento, los polipéptidos de u-PA modificados no efectúan la escisión de la forma zimógena de C3 para generar los fragmentos activados por C3a y C3b. De esta manera, los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente no escinden C3 entre los residuos 748-749 de SEQ ID NO: 47, lo que daría como resultado la generación de C3a y C3b. Los sitios de escisión de inhibición o inactivación de la proteína C3 de complemento se pueden determinar o identificar empíricamente. Si es necesario, se puede probar un polipéptido de u-PA modificado para su capacidad para inhibir el complemento como se describe en la sección E posterior y como se ejemplifica en los Ejemplos.

Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente catalizan la escisión inhibidora o inactivadora de la proteína C3 de complemento. Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente escinden la proteína C3 de complemento en cualquier secuencia de escisión siempre que los fragmentos C3 resultantes sean inactivos o no puedan activar una función efectora mediada por complemento. Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente tienen especificidad y/o selectividad alterada (es decir, disminuida) para dianas naturales de u-PA, que incluyen plasminógeno y uPAR. En un ejemplo, los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente tienen especificidad reducida para la escisión de plasminógeno. En otro ejemplo, los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente tienen selectividad reducida para unirse a uPAR. En algunos ejemplos, los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente tienen especificidad reducida para la escisión de plasminógeno y selectividad reducida para la unión a uPAR. En otros ejemplos, los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente tienen mayor especificidad para la escisión de la proteína C3 de complemento y menor especificidad para la escisión de plasminógeno. En otros ejemplos, los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente tienen mayor selectividad para la proteína C3 de complemento y menor selectividad para plasminógeno y/o uPAR.

Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente y descritos en los ejemplos son, por ejemplo, dominios de proteasa aislados de u-PA. También se contemplan porciones más pequeñas de estos que retienen la actividad de proteasa. Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente son mutantes del dominio de proteasa de u-PA, particularmente polipéptidos de u-PA modificados en los que el residuo Cys en el dominio de proteasa que está libre (es decir, no forma enlaces de disulfuro con ningún otro residuo Cys en la proteína) se sustituye con otra sustitución de aminoácido,

preferentemente con una sustitución de aminoácido conservadora o una sustitución que no elimina la actividad, tal como, por ejemplo, sustitución con Serina, y polipéptidos de u-PA modificados en los que se eliminan uno o más sitios de glicosilación. También se contemplan polipéptidos de u-PA modificados en los que también se contemplan otras sustituciones conservadoras de aminoácidos en las que se retiene la actividad catalítica (ver, por ejemplo, Tabla 3, para ejemplos de sustituciones de aminoácidos).

Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente contienen una o más modificaciones de aminoácidos de modo que escinden la proteína C3 de complemento de una manera que resulta en la inactivación o inhibición de complemento. Las modificaciones pueden ser una modificación de aminoácido individual, tal como reemplazos de aminoácido individual (sustituciones), inserciones o deleciones, o múltiples modificaciones de aminoácido, tal como reemplazos, inserciones o deleciones de múltiples aminoácidos. Los ejemplos de modificaciones son reemplazos de aminoácidos, incluidos reemplazos de aminoácidos individuales o múltiples. El reemplazo de aminoácidos puede ser una sustitución conservadora, tal como se expone en la Tabla 3, o una sustitución no conservadora, tal como cualquiera descrita en la presente. Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente pueden contener al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más posiciones modificadas en comparación con el polipéptido de u-PA que no contiene la modificación.

Las modificaciones descritas en la presente se pueden hacer en cualquier polipéptido de u-PA. Por ejemplo, las modificaciones se realizan en un polipéptido de u-PA humano que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye o se expone en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO:6, o variantes alélicas de estos; un polipéptido de u-PA de ratón que tiene una secuencia de aminoácidos que se incluye o expone en SEQ ID NO:52 o 66; un polipéptido de u-PA de rata que tiene una secuencia de aminoácidos que se incluye o expone en SEQ ID NO:53 o 67; un polipéptido de u-PA de vaca que tiene una secuencia de aminoácidos que se incluye o expone en SEQ ID NO:54 o 68; un polipéptido de u-PA porcino que tiene una secuencia de aminoácidos que se incluye o expone en SEQ ID NO:55 o 69; un polipéptido de u-PA de conejo que tiene una secuencia de aminoácidos que se incluye o expone en SEQ ID NO:56 o 70; un polipéptido de u-PA de pollo que tiene una secuencia de aminoácidos que se incluye o expone en SEQ ID NO:57 o 71; un polipéptido de u-PA de babuino amarillo que tiene una secuencia de aminoácidos que se incluye o expone en SEQ ID NO:58 o 72; un polipéptido de u-PA de orangután de Sumatra que tiene una secuencia de aminoácidos que se incluye o expone en SEQ ID NO:59 o 73; un polipéptido de u-PA de perro que tiene una secuencia de aminoácidos

que se incluye o expone en SEQ ID NO:60 o 74; un polipéptido de u-PA de ovino que tiene una secuencia de aminoácidos que se incluye o expone en SEQ ID NO:61 o 75; un polipéptido de u-PA de tití que tiene una secuencia de aminoácidos que se incluye o expone en SEQ ID NO:62; un polipéptido de u-PA de macaco rhesus que tiene una secuencia de aminoácidos que se incluye o expone en SEQ ID NO:63; un polipéptido de u-PA de gibón de mejilla blanca del norte que tiene una secuencia de aminoácidos que se incluye o expone en SEQ ID NO:64; y un polipéptido de u-PA de chimpancé que tiene una secuencia de aminoácidos que se incluye o expone en SEQ ID NO:65; o en variantes de secuencia o fragmentos catalítimamente activos que exhiben al menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:1-6 y 52-75.

Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente se pueden modificar en cualquier región o dominio de un polipéptido de u-PA proporcionado en la presente, siempre y cuando el polipéptido u-PA modificado conserve su capacidad para efectuar la inactivación o escisión inhibitoria de la proteína C3 de complemento. Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente pueden ser polipéptidos de cadena individual o dos cadenas, variantes de especies, variantes alélicas, isoformas o fragmentos catalíticamente activos de los mismos, tal como, por ejemplo, el dominio de proteasa de los mismos. Los polipéptidos de u-PA proporcionados en la presente pueden ser polipéptidos de u-PA truncados o de longitud completa. Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente pueden ser el dominio de proteasa de u-PA o una forma modificada del dominio de proteasa de u-PA. También se contemplan para su uso en la presente formas zimógenas, precursoras o maduras de polipéptidos de u-PA modificados, siempre que los polipéptidos de u-PA conserven su capacidad de efectuar escisión inhibidora o de inactivación de la proteína C3 de complemento. Las modificaciones en un polipéptido de u-PA también se pueden hacer a un polipéptido de u-PA que también contiene otras modificaciones, incluidas modificaciones de la secuencia primaria y modificaciones que no están en la secuencia primaria del polipéptido. Por ejemplo, una modificación descrita en la presente puede estar en un polipéptido de u-PA que es un polipéptido de fusión o polipéptido quimérico. Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente también incluyen polipéptidos que se conjugan con un polímero, tal como un reactivo PEG.

Para propósitos en la presente, la referencia a posiciones y aminoácidos para modificación, incluidos reemplazos o reemplazos de aminoácidos, en la presente están con referencia al polipéptido de u-PA expuesto en cualquiera de SEQ ID NO:1-6. Está dentro del nivel de un experto en la técnica hacer cualquiera de las modificaciones proporcionadas en la

presente en otro polipéptido de u-PA mediante la identificación del residuo de aminoácido correspondiente en otro polipéptido de u-PA, tal como el polipéptido de u-PA expuesto en cualquiera de SEQ ID NO:1-6 o una variante del mismo que exhibe al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con un polipéptido de u-PA expuesto en cualquiera de SEQ ID NO:1-6. Las posiciones correspondientes en otro polipéptido de u-PA se pueden identificar mediante alineación del polipéptido de u-PA con la referencia de un polipéptido de u-PA expuesto en cualquiera de SEQ ID NO:1-6. Para propósitos de modificación (por ejemplo, reemplazo de aminoácidos), el residuo de aminoácidos correspondiente puede ser cualquier residuo de aminoácidos, y no necesita ser idéntico al residuo expuesto en cualquiera de SEQ ID NO:1-6. Habitualmente, el residuo de aminoácidos correspondiente identificado por alineación con, por ejemplo, residuos en SEQ ID NO:5 es un residuo de aminoácidos que es idéntico a SEQ ID NO:5, o es un residuo de aminoácidos conservador o semiconservador al mismo. También se entiende que los reemplazos de ejemplo proporcionados en la presente se pueden realizar en el residuo correspondiente en un polipéptido de u-PA, tal como el dominio de proteasa de u-PA, siempre que el reemplazo sea diferente de lo que existe en la forma no modificada del polipéptido de u-PA, tal como el dominio de proteasa de u-PA. Con base en esta descripción y en la descripción en otra parte de la presente, está dentro del nivel de un experto en la técnica generar un polipéptido de u-PA modificado que contenga cualquiera de las mutaciones descritas, y analizar cada uno para detectar una propiedad o actividad como se describe en la presente.

Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente alteran la actividad de complemento mediante la inhibición mediada por proteólisis o inactivación de la proteína C3 de complemento. Adicionalmente, los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente tienen menor especificidad para la escisión de plasminógeno y/o unión a uPAR. Por ejemplo, los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente exhiben menos de 100% de la actividad tipo silvestre de un polipéptido de u-PA para la escisión de plasminógeno, tal como menos de 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% o menos de la actividad para la escisión de plasminógeno de un polipéptido de u-PA tipo silvestre o de referencia, tal como el polipéptido correspondiente que no contiene la modificación de aminoácidos. En otro ejemplo, los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente exhiben menos de 100% de la actividad de unión tipo silvestre de un polipéptido de u-PA para uPAR, tal como menos de 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% o menos de la actividad para la unión a uPAR de un polipéptido de u-PA tipo silvestre o de referencia, tal como el polipéptido correspondiente que no contiene la

modificación de aminoácidos.

En la presente también se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican para cualquiera de los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente. En algunos ejemplos, las moléculas de ácido nucleico codificantes también se pueden modificar para contener una secuencia señal heteróloga para alterar (por ejemplo, aumentar) la expresión y secreción del polipéptido. Los polipéptidos de u-PA modificados y moléculas de ácido nucleico codificantes proporcionadas en la presente se pueden producir o aislar por cualquier método conocido en la técnica que incluye aislamiento de fuentes naturales, aislamiento de proteínas producidas recombinantemente en células, tejidos y organismos, y por métodos recombinantes y por métodos que incluyen pasos *in silico*, métodos sintéticos y cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Los polipéptidos modificados y las moléculas de ácido nucleico codificantes proporcionadas en la presente se pueden producir por técnicas de ADN recombinante estándar conocidas por un experto en la técnica. Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para efectuar la mutación de uno o más aminoácidos en una proteína diana. Los métodos incluyen mutagénesis aleatoria o dirigida al sitio estándar de moléculas de ácido nucleico codificantes o métodos de síntesis de polipéptidos de fase sólida. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico que codifican para un polipéptido de u-PA se pueden someter a mutagénesis, tal como mutagénesis aleatoria de ácido nucleico codificante, PCR propensa a errores, mutagénesis dirigida al sitio, PCR superpuesta, transposición de genes u otros métodos recombinantes. El ácido nucleico que codifica para los polipéptidos se puede introducir entonces en una célula hospedadora para expresarse heterólogamente. Por lo tanto, también se proporcionan en la presente moléculas de ácido nucleico que codifican para cualquiera de los polipéptidos modificados proporcionados en la presente. En algunos ejemplos, los polipéptidos de u-PA modificados se producen de manera sintética, tal como usando síntesis de péptidos de fase sólida o de fase en solución. Las moléculas de ácido nucleico se pueden proporcionar en vectores de terapia génica, tal como vectores de AAV o adenovirus, para la expresión del polipéptido de u-PA modificado codificado in vivo, tal como en el ojo o para administración sistémica. El polipéptido de u-PA codificado puede ser un polipéptido de longitud completa o un dominio de proteasa u otra forma que esté activa o que se pueda activar.

Los polipéptidos de u-PA proporcionados en la presente se han modificado para tener mayor especificidad y/o selectividad para la escisión de una secuencia de escisión inhibidora o inactivación de polipéptidos de proteína C3 de complemento. u-PA se pueden modificar usando cualquier método conocido en la técnica para la modificación de proteínas. Estos métodos incluyen mutagénesis aleatoria y dirigida al sitio. Los ensayos tal como los

ensayos para la función biológica de activación del complemento proporcionados en la presente y conocidos en la técnica se pueden usar para evaluar la función biológica de un polipéptido de u-PA modificado para determinar si el polipéptido de u-PA modificado se dirige a la proteína C3 de complemento para escisión e inactivación. En la presente se proporcionan métodos de ejemplo para identificar un polipéptido de u-PA y los polipéptidos de u-PA modificados.

1. Polipéptidos de u-PA modificados de ejemplo

En la presente se proporcionan polipéptidos de u-PA modificados que contienen una o más, que incluyen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y más modificaciones de aminoácidos en un polipéptido de u-PA y que escinden la proteína C3 de complemento de modo que el complemento esté inhibido o inactivado. Las modificaciones se encuentran en la secuencia de aminoácidos primaria e incluyen reemplazos, deleciones e inserciones de residuos de aminoácidos. La modificación altera la especificidad/actividad del polipéptido de u-PA, cuando se encuentra en una forma activa. Los polipéptidos de u-PA modificados en la presente se seleccionan para reconocer y escindir un sitio diana en una proteína de complemento, particularmente C3, para inactivarlo. También se pueden modificar y analizar adicionalmente para tener especificidad/actividad reducida en sustratos *in vivo*, tal como plasminógeno. Se pueden seleccionar e identificar por cualquier método de detección de proteasa adecuado. Los polipéptidos de u-PA modificados en la presente se identificaron inicialmente usando el método de selección descrito en la patente de Estados Unidos No. 8,211,428, en la que una biblioteca de proteasas modificadas se hace reaccionar con una serpina cognada u otra serpina inhibidora que se modifica para incluir una secuencia diana en el bucle del sitio reactivo para capturar proteasas modificadas que escindirían dicha diana.

Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente muestran mayor actividad o especificidad o K_{cat}/K_m para la proteína C3 de complemento en un sitio que inactiva C3, y también pueden tener menor actividad o especificidad para plasminógeno y/o mostrar mayor selectividad, especificidad y/o actividad para una proteína C3 de complemento de sitio diana, por lo que el polipéptido de u-PA modificado inactiva C3. Los polipéptidos de u-PA modificados exhiben mayor actividad para escindir e inactivar C3 en comparación con la forma correspondiente tipo silvestre o tipo silvestre con el reemplazo C122S (por numeración de quimotripsina). En particular, el dominio de proteasa del polipéptido de u-PA modificado exhibe mayor actividad de escisión de inactivación de C3 en comparación con el dominio de proteasa de u-PA de SEQ ID NO: 5 (dominio de proteasa de u-PA con C122S). El incremento en la actividad puede ser 10%, 20%, 50%, 100%, 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces y más en comparación con el u-PA no modificado.

El polipéptido de u-PA modificado puede tener actividad reducida para un sustrato natural, tal como plasminógeno. Por ejemplo, los polipéptidos de u-PA modificados pueden exhibir de 0 a 99% de la actividad de u-PA de un polipéptido de u-PA tipo silvestre o de referencia, tal como el polipéptido de u-PA expuesto en SEQ ID NO:5, para plasminógeno y al menos 0.5 veces, 1 vez, 2 veces, 3 veces o más para escindir C3 para inactivarlo. Por ejemplo, los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente exhiben menos de o menos de aproximadamente 99%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% o menos de la actividad de u-PA de un polipéptido tipo silvestre o de referencia u-PA, tal como el polipéptido correspondiente que no contiene la modificación de aminoácidos (por ejemplo, reemplazo de aminoácidos), por ejemplo, un dominio de proteasa de u-PA expuesto en SEQ ID NO:5.

Por ejemplo, las posiciones de ejemplo que se pueden modificar, por ejemplo mediante reemplazo o sustitución de aminoácidos, incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de las posiciones que corresponden a la posición 173, 178, 179, 180, 181, 185, 186, 187, 188, 208, 209, 249, 250, 252, 306, 314 o 353 con referencia a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 (que corresponde a posiciones 30, 35, 36, 37, 37a, 38, 39, 40, 41, 60a, 60b, 97a, 97b, 99, 149, 157 o 192 de acuerdo con la numeración de quimotripsina). Por ejemplo, las posiciones de aminoácidos pueden ser reemplazos en posiciones que corresponden al reemplazo de fenilalanina (F) en una o más de posiciones 173, R178, R179, H180, R181, V185, T186, Y187, V188, D208, Y209, T249, L250, H252, Y306, M314 o Q353 con referencia a posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO:3 (que corresponden a F30, R35, R36, H37, R37a, V38, T39, Y40, V41, D60a, Y60b, T97a, L97b, H99, Y149, M157 y Q192, respectivamente de acuerdo con la numeración de quimotripsina).

Los reemplazos de aminoácidos de ejemplo en cualquiera de las posiciones anteriores se exponen en la Tabla 11. La referencia a la posición correspondiente en la Tabla 11 se refiere a las posiciones expuestas en SEQ ID NO:3. (Ver también los Ejemplos posteriores). Se entiende que los reemplazos se pueden realizar en la posición correspondiente en otro polipéptido de u-PA mediante alineación con la secuencia expuesta en SEQ ID NO:3, por lo que la posición correspondiente es la posición alineada. Por ejemplo, el reemplazo se puede realizar en el u-PA de dominio de proteasa con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2 o un dominio de proteasa de u-PA de referencia con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5. En algunos ejemplos, el o los reemplazos de aminoácidos pueden estar en la posición correspondiente en un polipéptido de u-PA como se expone en SEQ ID NO: 5 o una variante del mismo que tiene al menos o al menos aproximadamente 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 86%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,

98%, 99%, particularmente 95%, o más identidad de secuencia al mismo, siempre que el polipéptido de u-PA modificado resultante exhiba especificidad alterada (*es* decir, mejorada) hacia proteína C3 de complemento en comparación con una actividad de u-PA hacia plasminógeno y/o una selectividad alterada para proteína C3 de complemento. En un ejemplo, cualquiera o más de los reemplazos se encuentran en cualquiera de SEQ ID Núms:1-6, siempre y cuando el polipéptido de u-PA modificado resultante exhiba especificidad alterada (*es* decir, mejorada) hacia la proteína C3 de complemento en comparación con una actividad de u-PA hacia plasminógeno y/o una selectividad alterada para la proteína C3 de complemento.

Tabla 11. Mutaciones de ejemplo que dan como resultado una mayor actividad para la escisión de C3

Posición Correspondiente (en SEQ ID NO:3)	Posición correspondiente (numeración quimotripsina)	Reemplazo
173	30	Y
178	35	W Y Q
179	36	H
180	37	E P D N G K Y
181	37a	Q P E N S
185	38	D E
186	39	W Y F
187	40	H F Q
188	41	R L
208	60a	P T
209	60b	Q H S A T L
249	97a	E I
250	97b	A G
252	99	Q
279	122	S
306	149	K R
314	157	K
353	192	H

Las modificaciones de aminoácidos de ejemplo en los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente incluyen, pero no se limitan a, reemplazo con tirosina (Y) en una posición que corresponde a la posición 173 (30 mediante numeración de quimotripsina); W en una posición que corresponde a la posición 178 (35 mediante numeración de quimotripsina); Y en una posición que corresponde a la posición 178; Q en una posición que corresponde a la posición 178; H en una posición que corresponde a la posición 179 (36 mediante numeración de quimotripsina); E en una posición que corresponde a la posición 180 (37 mediante numeración de quimotripsina); P en una posición que corresponde a la posición 180; D en una posición que corresponde a la posición 180; N en una posición

que corresponde a la posición 180; G en una posición que corresponde a la posición 180; K en una posición que corresponde a la posición 180; Y en una posición que corresponde a la posición 180; Q en una posición que corresponde a la posición 181 (37a mediante numeración de quimotripsina); P en una posición que corresponde a la posición 181; E en una posición que corresponde a la posición 181; N en una posición que corresponde a la posición 181; S en una posición que corresponde a la posición 181; D en una posición que corresponde a la posición 185 (38 mediante numeración de quimotripsina); E en una posición que corresponde a la posición 185; W en una posición que corresponde a la posición 186 (39 mediante numeración de quimotripsina); Y en una posición que corresponde a la posición 186; F en una posición que corresponde a la posición 186; H en una posición que corresponde a la posición 187 (40 mediante numeración de quimotripsina); F en una posición que corresponde a la posición 187; Q en una posición que corresponde a la posición 187; R en una posición que corresponde a la posición 188 (41 mediante numeración de quimotripsina); L en una posición que corresponde a la posición 188; P en una posición que corresponde a la posición 208; T en una posición que corresponde a la posición 208 (60a mediante numeración de quimotripsina); Q en una posición que corresponde a la posición 209 (60b mediante numeración de quimotripsina); H en una posición que corresponde a la posición 209; S en una posición que corresponde a la posición 209; A en una posición que corresponde a la posición 209; T en una posición que corresponde a la posición 209; L en una posición que corresponde a la posición 209; E en una posición que corresponde a la posición 249 (97a mediante numeración de quimotripsina); I en una posición que corresponde a la posición 249; A en una posición que corresponde a la posición 250 (97b mediante numeración de quimotripsina); G en una posición que corresponde a la posición 250; Q en una posición que corresponde a la posición 252 (99 mediante numeración de quimotripsina); K en una posición que corresponde a la posición 306 (149 mediante numeración de quimotripsina); R en una posición que corresponde a la posición 306; K en una posición que corresponde a la posición 314 (157 mediante numeración de quimotripsina); o H en una posición que corresponde a la posición 353 (192 mediante numeración de quimotripsina); cada uno con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO:3. S en una posición que corresponde a la posición 279 (122S) por numeración de quimotripsina) reemplaza un Cys libre para reducir de esta manera una tendencia a la agregación.

Los polipéptidos de u-PA modificados de ejemplo que contienen 2 o más modificaciones de aminoácidos se exponen en la Tabla 12 posterior, y su actividad para escindir C3 descrita en la Tabla 14. La secuencia ID NO. hace referencia a un dominio de proteasa de u-PA de ejemplo que contiene los reemplazos mencionados, que incluyen el

reemplazo en C122S para reducir o eliminar la agregación. C122 es una cisteína libre, que puede dar como resultado la reticulación entre los polipéptidos de proteasa. Se entiende que el dominio de proteasa es de ejemplo, y las moléculas de longitud completa y precursoras, así como otras porciones catalíticamente activas del dominio de proteasa, polipéptido de longitud completa y precursor pueden incluir los reemplazos mencionados, para formar polipéptidos de u-PA modificados de longitud completa activados y otras formas.

Tabla 12. polipéptidos de u-PA modificados

Numeración de u-PA madura	**Numeración de quimotripsina**	**SEQ ID NO de ejemplo**
F173Y/V185D/Y187H/V188R/L250A/H252Q/C279S/M314K	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	8
F173Y/R178W/R179H/H180E/V185E/T186W/Y187H/V188R/Y209Q/T249E/L250A/H252Q/C279S/Y306K/M314K	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	9
F173Y/R178W/R179H/H180D/V185E/T186Y/Y187F/V188R/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R/M314K	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	10
R178W/R179H/H180N/V185E/T186F/Y187F/V188R/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R/M314K/Q353H	R35W/R36H/H37N/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192H	11
F173Y/R178Y/R179H/H180K/V185E/T186F/Y187F/V188R/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R/M314K	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	12
F173Y/R178W/R179H/H180N/V185E/T186Y/Y187F/V188R/Y209S/T249E/L250A/H252Q/C279S/Y306K/M314K	F30Y/R35W/R36H/H37N/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	13
F173Y/R178W/R179H/H180P/V185E/T186Y/Y187F/V188R/Y209S/T249E/L250A/H252Q/C279S/Y306K/M314K	F30Y/R35W/R36H/H37P/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	14
V185E/Y187Q/V188L/Y209L/L250A/H252Q/ C279S	V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	15
F173Y/R178Q/R179H/H180G/R181E/V185E/T186F/Y187F/V188R/D208P/Y209S/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R/M314K	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39F/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	16
F173Y/R178Y/R179H/H180P/R181Q/V185E/T186Y/Y187F/V188R/Y209H/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R/M314K	F30Y/R35Y/R36H/H37P/R37aQ/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bH/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	17
R178Q/H180Y/R181E/V185E/T186Y/V188R/D208T/Y209T/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aT/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	18
R178W/H180P/R181N/V185E/T186Y/V188R/D208P/Y209L/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R	R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	19

Tabla 12. polipéptidos de u-PA modificados

Numeración de u-PA madura	Numeración de quimotripsina	SEQ ID NO de ejemplo
R178W/H180D/R181P/V185E/T186W/V188R/Y209A/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R	R35W/H37D/R37aP/V38E/T39W/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	20
R178Q/H180Y/R181E/V185E/T186Y/V188R/D208P/Y209Q/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	21
H180Y/R181E/V185E/T186Y/V188R/D208P/Y209Q/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R	H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	22
R178Q/R181E/V185E/T186Y/V188R/D208P/Y209Q/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R	R35Q/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	23
R178Q/H180Y/V185E/T186Y/V188R/D208P/Y209Q/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R	R35Q/H37Y/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	24
R178Q/H180Y/R181E/T186Y/V188R/D208P/Y209Q/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R	R35Q/H37Y/R37aE/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	25
R178Q/H180Y/R181E/V185E/V188R/D208P/Y209Q/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	26
R178Q/H180Y/R181E/V185E/T186Y/D208P/Y209Q/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	27
R178Q/H180Y/R181E/V185E/T186Y/V188R/Y209Q/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	28
R178Q/H180Y/R181E/V185E/T186Y/V188R/D208P/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	29
R178Q/H180Y/R181E/V185E/T186Y/V188R/D208P/Y209Q/L250A/H252Q/C279S/Y306R	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	30
R178Q/H180Y/R181E/V185E/T186Y/V188R/D208P/Y209Q/T249I/H252Q/C279S/Y306R	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/H99Q/C122S/Y149R	31
R178Q/H180Y/R181E/V185E/T186Y/V188R/D208P/Y209Q/T249I/L250A/C279S/Y306R	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/C122S/Y149R	32
R178Q/H180Y/R181E/V185E/T186Y/V188R/D208P/Y209Q/T249I/L250A/H252Q/C279S	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	33
Y187Q/V188L/Y209L/ L250A/H252Q/C279S	Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	34
V185E/Y187Q/ Y209L/L250A/H252Q/ C279S	V38E/Y40Q/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	35
V185E/Y187Q/ V188L/L250A/H252Q/ C279S	V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S	36

Tabla 12. polipéptidos de u-PA modificados		
Numeración de u-PA madura	**Numeración de quimotripsina**	**SEQ ID NO de ejemplo**
V185E/Y187Q/ V188L/Y209L/H252Q/ C279S	V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/H99Q/ C122S	37
V185E/Y187Q/ V188L/ Y209L/L250A/ C279S	V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/ C122S	38
Y187Q/ V188L/L250A/H252Q/C279S	Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S	39
Y187Q/ V188L/L250A/ C279S	Y40Q/V41L/L97bA/C122S	40
R181S/ V188R/ L250G/ H252Q/C279S	R37aS/V41R/L97bG/H99Q/C122S	41
T186Y/ V188R/ L250A/ H252Q/C279S	T39Y/V41R/L97bA/H99Q/C122S	42
T186Y/V188R/Y209Q/L250A/H252Q/ C279S	T39Y/V41R/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S	43
T186Y/V188R/D208P/L250A/H252Q/ C279S	T39Y/V41R/D60aP/L97bA/H99Q/C122S	44

2. Modificaciones Adicionales

Cualquiera de los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente puede contener una o más modificaciones adicionales. Las modificaciones adicionales pueden incluir, por ejemplo, cualquier sustitución, deleción o inserción de aminoácidos conocida en la técnica, habitualmente cualquiera que aumente la especificidad hacia la proteína C3 de complemento en comparación con la actividad de u-PA hacia plasminógeno y/o altere la selectividad para proteína C3 de complemento. Además, se contemplan modificaciones que alteran cualquier otra actividad de interés. Se conoce desde hace tiempo en la técnica que las modificaciones de aminoácidos de la secuencia primaria son aditivas (ver, *por* ejemplo, Wells (1990) *Biochem 29*:8509-8517). Cualquier polipéptido de u-PA modificado proporcionado en la presente puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más modificaciones de aminoácidos adicionales para proporcionar actividades adicionales o alterar actividades.

Ejemplos de modificaciones adicionales que se pueden incluir en los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en las patentes de Estados Unidos Núms. 4,997,766; 5,126,134; 5,129,569; 5,275,946; 5,571,708; 5,580,559; 5,648,253; 5,728,564; 5,759,542; 5,811,252; 5,891,664; 5,932,213; 5,980,886; 6,248,712; 6,423,685; 7,070,925; 7,074,401; 7,807,457; 7,811,771; 8,211,428; publicación de patente de Estados Unidos Núms. 2002/0106775; 2004/0265298; 2004/0146938; 2009/0010916; 2011/0055940; 2008/0020416; 2006/0142195; publicación de patente internacional Núms. WO1988/008451; WO1989/010401; WO1990/004635; WO1996/013160; WO 2002/40503; Petersen *et al*. (2001) *Eur J Biochem* 268:4430-4439;

Skeldal *et al.* (2006) *FEBS J* 273:5143-5149; Sun *et al.* (1997) *J Biol Chem* 272:23818-23823; Blouse *et al.* (2009) *J Biol Chem* 284:4647-4657; Nelles *et al.* (1987) *JBC* 262:5682-5689; Crowley *et al*. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 90:5021-5025; Zeslawska *et al.* (2000) *J Mol Biol* 301:465-475; Zeslawska *et al.* (2003) *J Mol Biol* 328:109-118; Quax *et al.* (1998) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:693-701; Homandberg y Wai (1990) *Thrombin Res* 58:403-412; Zaitsev *et al.* (2010) *Blood* 115:5241-5248; Yang *et al.* (1994) *Biochemistry* 33:606-612; Davidow *et al.* (1991) *Protein Eng* 4:923-928; Boutad and Castellino (1993) *Arch Biochem Biophys* 303:222-230; Tsujikawa *et al.* (1996) *Yeast* 12:541-553; Carriero *et al.* (2002) *Biol Chem* 383:107-113; Stopelli *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 82:4939-4943; Stoppelli *et al.* (1987) *J Biol Chem* 262:4437-4440; Franco *et al.* (1998) *J Biol Chem* 273:27734-27740; Franco *et al.* (1997) *J Cell Biol* 137:779-791; Li *et al.* (1995) *J Biol Chem* 270:30282-30285; Botkjaer *et al.* (2009) *Biochemistry* 48:9606-9617; Bdeir *et al.* (2003) *Blood* 102:3600-3608; Eguchi *et al.* (1990) *J Biochem* 108:72-79; Miyake *et al.* (1988) *J Biochem* 104:643-647; Bergstrom *et al.* (2003) *Biochem* 42:5395-5402; Sun and Liu (2005) *Proteins* 61:870-877; Sun *et al.* (1998) *Biochemistry* 37:2935-2940; Anderson *et al.* (2008) *Biochem J* 412:447-457; Li et al. (1992) *Biochim Biophys Acta* 1159:37-43; Lijnen *et al.* (1988) *Eur J Biochem* 177:575-582; Lijnen *et al.* (1988) *Eur J Biochem* 172:185-188; Lijnen *et al.* (1992) *Eur J Biochem* 205:701-709; Lijnen *et al.* (1994) *Eur J Biochem* 224:567-574; Lijnen *et al.* (1990) *J Biol Chem* 265:5232-5236; Yoshimoto *et al.* (1996) *Biochim Biophys Acta* 1293:83-89; Magdolen *et al.* (1996) *Eur J Biochem* 237:743-751; Nienaber *et al.* (2000) *J Biol Chem* 275:7239-7248; Gurewich *et al.* (1988) *J Clin Invest* 1956-1962; Liu *et al.* (1996) *Biochemistry* 35:14070-14076; Liu *et al.* (2002) *Circ Res* 90:757-763; Mukhina *et al.* (2000) *J Biol Chem* 275:16450-16458; Peng *et al.* (1997) *Biochem Mol Biol Int* 41:887-894; Turkmen *et al.* (1997) *Electrophoresis* 18:686-689; Peng *et al.* (1999) *Biotechnol Lett* 21:979-985; Ueshima *et al.* (1994) *Thromb Haemost* 71:134-140; y Melnick *et al.* (1990) *J Biol Chem* 265:801-807. Ejemplos no limitantes de las modificaciones de aminoácido descritas en la técnica incluyen cualquiera de una o más de S9A, C13A, T18A, C19A, V20A, S21A, N22Y, N22A, N22Q, N22R, K23A, K23H, K23Q, K23E, Y24A, F25A, S26A, S26F, N27A, N27R, I28A, H29A, H29R, W30A, W30R, W30F, N32S, K35A, G38R, E43A, I44A, D45A, K46A, S47A, S47G, K48A, K48P, T49A, Y51A, N54A, L80H, Q81R, Q82P, T83R, H99Y, P105A, D106A, N107A, R108A, R108D, R109A, R110A, G118N, L119R, K120R, K120A, P121L, L122T, L122R, V123Y, V123W, Q124A, E125A, H129A, D130G, C131W, K135G, K135S, K135Y, K135Q, K136P, S138E, C148S, C148A, K151E, T152A, R154G, R154P, R154A, P155R, P155L, P155A, P155N, P155S, P155G, P155Q, R156P, R156A, R156H, R156S, R156Y, R156E, R156G, R156L, F157L, F157T, F157G, F157Q, F157D, F157E, K158R, K158E, K158A, K158H, K158S, K158Y, K158G,

K158W, K158V, K158M, I159R, I159A, I159P, I159G, I160A, I160K, G162R, E163A, F164V, F164A, F164V, I167L, P171L, F173I, F173V, F173L, F173T, F173G, F173M, A175S, Y177A, R178A, R179A, H180A, R181A, S184A, T186A, T186E, T186D, Y187A, Y187H, V188A, S192N, I194M, S195A, H204A, H204Q, F206A, D208A, Y209A, P210A, K211A, K211Q, K212A, E213A, D214A, Y215A, I216A, Y218A, R221A, S222L, R223G, R223A, L224A, L224P, N225A, S226P, N227A, Q229A, E231G, K233E, K233A, F234A, E235K, E235A, E237A, I240V, K243E, K243A, D244A, Y245A, D255A, R262A, K264A, E265A, R267A, C268Y, C279S, C279A, F289L, G290D, E294G, I295T, G297D, F298A, G299A, G299H, K300A, K300H, K300W, E301D, E301A, E301H, N302A, N302Q, N302V, N302L, N302I, N302S, N302T, S303E, S303A, S303E, T304A, T304V, T304M, D305A, Y306A, Y306G, Y306V, Y306H, L307A, Y308A, P309A, P309S, P309T, P309V, P309G, P309N, P309L, P309D, P309R, P309H, P309F, P309W, E310A, Q311A, L312P, L312V, L312M, K313Y, K313T, K313A, K313H, T315A, T315I, V316A, V317A, Y330H, A343T, D344A, Q346A, W347A, K348A, K348E, T349I, D350A, S351A, Q353A, G354R, D355A, S356A, G357E, G366C, R378C, R378A, K383A, K385A, R400A, H402A, K404A, E405A, E406A G408A, o A410V, de acuerdo a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:3. Las modificaciones adicionales incluyen reemplazos de aminoácido que introducen un sitio de glicosilación.

Los polipéptidos de u-PA modificados incluyen aquellos que contienen modificaciones químicas o postraduccionales. En algunos ejemplos, los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente no contienen modificaciones químicas o postraduccionales. Las modificaciones químicas y postraduccionales incluyen, pero no se limitan a, pegilación, sialación, albuminación, glicosilación, farnisilación, carboxilación, hidroxilación, PASilación, HESilación, fosforilación, unión a uno o más dominios de multimerización, tal como Fc, y otras modificaciones de polipéptidos conocidas en la técnica. Además de una o más modificaciones de aminoácidos, tal como reemplazos, inserciones, deleciones de aminoácidos y combinaciones de los mismos, proporcionados en la presente, los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente se pueden conjugar o fusionar con cualquier porción usando cualquier método conocido en la técnica, incluidos métodos químicos y recombinantes, proporcionando el polipéptido resultante, cuando se encuentra en forma activa, conserva la capacidad de efectuar la escisión inhibitoria o de inactivación de la proteína C3 de complemento.

Por ejemplo, además de una o más modificaciones de aminoácidos, tal como reemplazos de aminoácidos, proporcionados en la presente, los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente también pueden contener otras modificaciones

que están o no en la secuencia primaria del polipéptido, incluyendo, pero no limitado a, modificación con una porción de carbohidratos, una porción polietilenglicol (PEG), una porción de silación, un dominio Fc de inmunoglobulina G o cualquier otro dominio o porción. Por ejemplo, se pueden realizar dichas modificaciones adicionales para aumentar la estabilidad o semivida en suero de la proteína.

a. Inmunogenicidad disminuida

Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente se pueden modificar para tener inmunogenicidad disminuida. La inmunogenicidad disminuida se puede efectuar mediante cambios de secuencia que eliminan epítopos antigénicos del polipéptido o mediante la alteración de modificaciones postraduccionales. Un experto en la técnica está familiarizado con métodos para identificar epítopos antigénicos en un polipéptido (*ver*, por ejemplo, Liang *et al*. (2009) *BMC Bioinformatics*, 10:302; Yang *et al*. (2009) *Rev. Med. Virol*., 19:77-96). En algunos ejemplos, uno o más aminoácidos se pueden modificar para remover o alterar un epítopo antigénico. En otro ejemplo, alterar la glicosilación de una proteína también puede afectar la inmunogenicidad. Por ejemplo, se contempla alterar la glicosilación del péptido, siempre y cuando los polipéptidos conserven la capacidad de efectuar la escisión inhibitoria o de inactivación de la proteína C3 de complemento. Los sitios de glicosilación se pueden remover por mutaciones simples. Los sitios de glicosilación se pueden agregar mediante la introducción de una secuencia canónica, tal como mediante inserción o mutaciones individuales o múltiples, tal como NXS(T), donde X no es una prolina. Los sitios de glicosilación también pueden aumentar la semivida en suero.

b. Dominio Fc

Los polipéptidos de u-PA modificados se pueden enlazar a la región Fc de un polipéptido de inmunoglobulina. Habitualmente, esta fusión retiene al menos una bisagra funcionalmente activa, dominios C_H2 y C_H3 de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. Por ejemplo, una secuencia Fc de longitud completa de IgG1 incluye aminoácidos 99-330 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 45 posterior.

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys.
325 330

Una secuencia de Fc de ejemplo para hIgG1 se expone en SEQ ID NO: 50:

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
1 5 10 15
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
35 40 45
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
50 55 60
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
65 70 75 80
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
85 90 95
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
100 105 110
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
115 120 125
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
130 135 140
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
145 150 155 160
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
165 170 175
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
180 185 190
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
195 200 205
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
210 215 220
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

Contiene casi toda la secuencia bisagra que corresponde a aminoácidos 100-110 de SEQ ID NO:45; la secuencia completa para el dominio C_H2 y C_H3 como se expone en SEQ ID NO:45.

Otro polipéptido de Fc de ejemplo se expone en la publicación de solicitud PCT No. WO 93/10151, y es un polipéptido de cadena simple que se extiende desde la región bisagra de extremo N hasta el extremo C natural de la región Fc de un anticuerpo IgG1 humano (SEQ ID NO:50). El sitio preciso en el que se realiza el enlace no es crítico: los sitios particulares son bien conocidos y se pueden seleccionar con el fin de optimizar la actividad biológica, secreción o características de unión del polipéptido HABP. Por ejemplo, otras secuencias de polipéptidos de Fc de ejemplo comienzan en el aminoácido C109 o P113 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 45 (ver, por ejemplo, publicación de Estados Unidos No. 2006/0024298).

Además de hIgG1 Fc, también se pueden usar otras regiones Fc y otros dominios de multimerización. Por ejemplo, cuando las funciones efectoras mediadas por interacciones Fc/FcγR se deben minimizar, se contempla la fusión con isotipos de IgG que reclutan células efectoras o complemento de forma deficiente, tal como, por ejemplo, la Fc de IgG2 o IgG4. Además, las fusiones Fc pueden contener secuencias de inmunoglobulina que están sustancialmente codificadas por genes de inmunoglobulina pertenecientes a cualquiera de las clases de anticuerpos, incluyendo, pero no limitado a IgG (incluyendo subclases humanas IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), IgA (incluyendo subclases humanas IgA1 e IgA2), IgD, IgE e IgM clases de anticuerpos. Los ligadores se pueden usar para unir covalentemente Fc a otro polipéptido para generar una quimera de Fc.

Los dominios de Fc modificados también son bien conocidos. En algunos ejemplos, la región Fc se modifica de modo que exhiba unión alterada a un FcR para dar como resultado una función efectora alterada (*es* decir, más o menos) que la función efectora de una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina tipo silvestre. Por lo tanto, un dominio Fc modificado puede tener afinidad alterada, incluyendo pero no limitado a, afinidad aumentada o baja o nula para el receptor Fc. Por ejemplo, las diferentes subclases de IgG tienen diferentes afinidades por las FcγR, con IgG1 e IgG3 que habitualmente se unen de forma sustancial mejor a los receptores que IgG2 e IgG4. Diferentes FcγR median diferentes funciones efectoras. FcγR1, FcγRIIa/c y FcγRIIIa son reguladores positivos de activación activada por complejo inmunitario, caracterizados por tener un dominio intracelular que tiene un motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM). FcγRIIb, sin embargo, tiene un motivo de inhibición de inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) y, por lo tanto, es inhibidor. Alterar la afinidad de una región Fc para un receptor puede modular las funciones efectoras y/o propiedades farmacocinéticas asociadas por el dominio Fc. Los dominios Fc modificados se conocen por un experto en la técnica y se describen en la literatura, ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos No. 5,457,035; Publicación de Patente de Estados

Unidos No. US 2006/0024298; y Publicación Internacional de Patente No. WO 2005/063816 para modificaciones de ejemplo.

Los polipéptidos quiméricos resultantes que contienen porciones Fc, y multímeros formados a partir de los mismos, se pueden purificar fácilmente mediante cromatografía de afinidad sobre columnas de proteína A o proteína G.

En otro ejemplo, el polipéptido de u-PA modificado se puede enlazar a albúmina de suero humano (HSA), tal como residuos 25-608 de HSA, o la longitud completa, o porción de los mismos:

10 20 30 40 50
MKWVTFISLL FLFSSAYSRG VFRR**DAHK**SE VAHRFKDLGE ENFKALVLIA
60 70 80 90 100
FAQYLQQCPF EDHVKLVNEV TEFAKTCVAD ESAENCDKSL HTLFGDKLCT
110 120 130 140 150
VATLRETYGE MADCCAKQEP ERNECFLQHK DDNPNLPRLV RPEVDVMCTA
160 170 180 190 200
FHDNEETFLK KYLYEIARRH PYFYAPELLF FAKRYKAAFT ECCQAADKAA
210 220 230 240 250
CLLPKLDELR DEGKASSAKQ GLKCASLQKF GERAFKAWAV ARLSQRFPKA
260 270 280 290 300
EFAEVSKLVT DLTKVHTECC HGDLLECADD RADLAKYICE NQDSISSKLK
310 320 330 340 350
ECCEKPLLEK SHCIAEVEND EMPADLPSLA ADFVGSKDVC KNYAEAKDVF
360 370 380 390 400
LGMFLYEYAR RHPDYSVVLL LRLAKTYETT LEKCCAAADP HECYAKVFDE
410 420 430 440 450
FKPLVEEPQN LIKQNCELFE QLGEYKFQNA LLVRYTKKVP QVSTPTLVEV
460 470 480 490 500
SRNLGKVGSK CCKHPEAKRM PCAEDCLSVF LNQLCVLHEK TPVSDRVTKC
510 520 530 540 550
CTESLVNGRP CFSALEVDET YVPKEFNAET FTFHADICTL SEKERQIKKQ
560 570 580 590 600
TALVELVKHK PKATKEQLKA VMDDFAAFVE KCCKADDKET CFAEEGKKLV
AASQ**AALG**L

c. Conjugación a polímeros

En algunos ejemplos, los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente se conjugan con otros polímeros. Los polímeros pueden aumentar el tamaño del polipéptido para reducir el aclaramiento renal y, por lo tanto, aumentar la semivida o para modificar la estructura del polipéptido para aumentar la semivida o reducir la inmunogenicidad. Los polímeros de ejemplo que se pueden conjugar con los polipéptidos de u-PA incluyen homopolímeros naturales y sintéticos, tal como polioles (*es* decir, poli-OH), poliaminas (*es* decir, poli-NH_2) y ácidos policarboxílicos (*es* decir, poli-COOH), y otros heteropolímeros, es decir, polímeros que comprenden uno o más grupos de acoplamiento diferentes, *por* ejemplo, un grupo hidroxilo y grupos amina. Los ejemplos de moléculas poliméricas adecuadas incluyen moléculas poliméricas seleccionadas de entre óxidos de polialquileno (PAO), tal como polialquilenglicoles (PAG), que incluyen polietilenglicoles (PEG), metoxipolietilenglicoles (mPEG) y polipropilenglicoles, éteres de PEG-glicidilo (Epox-PEG), PEG-oxicarbonilimidazol (CDI-PEG), polietilenglicoles ramificados (PEG), alcohol polivinílico (PVA), policarboxilatos, polivinilpirrolidona, poli- D,L-aminoácidos, anhídrido de ácido polietileno-co-maleico, anhídrido de ácido poliestireno-co-maleico, dextranos que incluyen carboximetil-dextranos, heparina, albúmina homóloga, celulosas, que incluyen metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboxietilcelulosa e hidroxipropilcelulosa, hidrolisatos de quitosano, almidones tal como hidroxietil-almidones e hidroxipropil-almidones, glucogena, agarosas y derivados de los mismos, goma guar, pululano, inulina, goma xantana, carragenina, pectina, hidrolizados de ácido algínico y biopolímeros.

Habitualmente, los polímeros son óxidos de polialquileno (PAO), tal como óxidos de polietileno, tal como PEG, habitualmente mPEG, que tienen pocos grupos reactivos capaces de reticularse. Habitualmente, los polímeros son moléculas poliméricas no tóxicas tal como (metoxi)polietilenglicol (mPEG) que se pueden conjugar covalentemente con los polipéptidos de u-PA (*por* ejemplo, a grupos de unión en la superficie de proteína) usando una química relativamente simple.

Las moléculas poliméricas adecuadas para unión a los polipéptidos de u-PA incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG) y derivados de PEG tal como metoxi-polietilenglicoles (mPEG), éteres de PEG-glicidilo (Epox-PEG), PEG-oxicarbonilimidazol (CDI-PEG), PEG ramificados y óxido de polietileno (PEO) (ver, por ejemplo, Roberts et al., Advanced Drug Delivery Review 2002, 54: 459-476; Harris and Zalipsky (eds.) “Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications” ACS Symposium Series 680, 1997; Mehvar *et al*., *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.,* 3(1):125-136, 2000; Harris y Chess (2003) *Nat Rev Drug Discov.* 2(3):214-21; and Tsubery, *J Biol. Chem* 279(37):38118-24, 2004). La molécula polimérica puede tener un peso molecular que varía habitualmente de aproximadamente 3

kDa a aproximadamente 60 kDa. En algunas modalidades, la molécula polimérica que se conjuga con un polipéptido de u-PA proporcionado en la presente tiene un peso molecular de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más de 60 kDa.

Los métodos para modificar polipéptidos mediante la unión covalente (conjugación) de un PEGF o derivado de PEG (*es* decir, “PEGilación”) son bien conocidos en la técnica (ver, *por* ejemplo, U.S. 2006/0104968; U.S. 5,672,662; U.S. 6,737,505; y U.S. 2004/0235734). Las técnicas para PEGilación incluyen, pero no se limitan a, ligadores especializados y químicas de acoplamiento (ver, *por* ejemplo, Harris, *Adv*. *Drug Deliv. Rev*. 54:459-476, 2002), unión de múltiples porciones PEG a un solo sitio de conjugación (tal como mediante el uso de PEG ramificados; ver, *por* ejemplo, Veronese *et al*., *Bioorg*. *Med. Chem. Lett.* 12:177-180, 2002), PEGilación y/o mono-PEGilación específica del sitio (ver, *por* ejemplo Chapman *et al*. *Nature Biotech*. 17:780-783, 1999) y PEGilación enzimática dirigida al sitio (ver, *por* ejemplo, Sato, *Adv*. *Drug Deliv. Rev.,* 54:487-504, 2002) (ver, también, por ejemplo, Lu y Félix (1994) *Int. J. Peptide Protein Res*. 43:127-138; Lu y Félix (1993) *Peptide Res*. 6:142-6, 1993; Felix *et al*. (1995) *Int. J. Peptide Res.* 46:253-64; Benhar *et al*. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:13398-404; Brumeanu *et al*. (1995) *J Immunol*. 154:3088-95; ver también, Caliceti *et al*. (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55(10):1261-77 y Molineux (2003) *Pharmacotherapy* 23 (8 Pt 2):3S-8S). Los métodos y técnicas descritos en la técnica pueden producir proteínas que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 derivados de PEG o PEG unidos a una molécula de proteína individual (véase, *por* ejemplo, U.S. 2006/0104968).

Se han descrito numerosos reactivos para PEGilación en la técnica. Estos reactivos incluyen, pero no se limitan a, PEG activado por N-hidroxisuccinimidilo (NHS), succinimidilo mPEG, mPEG2-N-hidroxisuccinimida, mPEG succinimidilo alfa-metilbutanoato, propionato de succinimidilo mPEG, butanoato de succinimidilo mPEG, éster succinimidílico de ácido carboximetil 3-hidroxibutanoico de mPEG, propionato de succinimidilo de PEG homobifuncional, propionaldehído homobifuncional PEG, butiraldehído homobifuncional PEG, Maleimida PEG, Hidrazida PEG, p-nitrofenilcarbonato PEG, carbonato de mPEG-benzotriazol, propionaldehído PEG, mPEG butiraldehído, butiraldehído mPEG2 ramificado, acetilo mPEG, piperidona mPEG, metilcetona mPEG, maleimida "sin enlace" de mPEG, mPEG vinil sulfona, tiol de mPEG, ortopiridiltioéster mPEG,Disulfuro de ortopiridilo mPEG, Fmoc-PEG-NHS, Boc-PEG-NHS, vinilsulfona PEG-NHS, acrilato PEG-NHS, fluoresceína PEG-NHS y biotina PEG-NHS (ver, *por ejemplo*, Monfardini *et al*., *Bioconjugate Chem*. 6:62-69, 1995; Veronese *et al*., *J. Bioactive Compatible Polymers* 12:197-207, 1997; U.S. 5,672,662; U.S. 5,932,462; U.S. 6,495,659; U.S. 6,737,505; U.S. 4,002,531; U.S. 4,179,337; U.S. 5,122,614; U.S. 5,183,550; U.S. 5,324, 844; U.S. 5,446,090; U.S. 5,612,460; U.S.

5,643,575; U.S. 5,766,581; U.S. 5,795, 569; U.S. 5,808,096; U.S. 5,900,461; U.S. 5,919,455; U.S. 5,985,263; U.S. 5,990, 237; U.S. 6,113,906; U.S. 6,214,966; U.S. 6,258,351; U.S. 6,340,742; U.S. 6,413,507; U.S. 6,420,339; U.S. 6,437,025; U.S. 6,448,369; U.S. 6,461,802; U.S. 6,828,401; U.S. 6,858,736; U.S. 2001/0021763; U.S. 2001/0044526; U.S. 2001/0046481; U.S. 2002/0052430; U.S. 2002/0072573; U.S. 2002/0156047; U.S. 2003/0114647; U.S. 2003/0143596; U.S. 2003/0158333; U.S. 2003/0220447; U.S. 2004/0013637; US 2004/0235734; U.S. 2005/000360; U.S. 2005/0114037; U.S. 2005/0171328; U.S. 2005/0209416; EP 01064951; EP 0822199; WO 00176640; WO 0002017; WO 0249673; WO 9428024; y WO 0187925).

d. Dominio de transducción de proteína

Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente se pueden enlazar, tal como una proteína de fusión que contiene un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, conjugado con un dominio de transducción de proteína (PTD) que aumenta la retención del anticuerpo en un sitio objetivo para terapia, tal como un sitio de mucosa, tal como el ojo. Cualquier PTD se puede emplear siempre y cuando el PTD promueva la unión a superficies de células diana en el sitio terapéutico (por ejemplo, sitio mucoso) y/o absorción del polipéptido de u-PA modificado por células diana en el sitio terapéutico (por ejemplo, sitio mucoso, tal como el ojo).

En general, los PTD incluyen péptidos catiónicos cortos que se pueden unir a la superficie celular a través de la unión electrostática a la membrana celular y pueden ser absorbidos por la célula por translocación de membrana (Kabouridis (2003) *TRENDS Biotech* 21(11) 498-503). Los PTD proporcionados en general interactúan con una célula diana mediante la unión a glicosaminoglicanos (GAG), tal como, por ejemplo, ácido hialurónico, heparina, sulfato de heparán, sulfato de dermatán, sulfato de queratina o sulfato de condroitina y sus derivados.

El dominio de transducción de proteína puede ser de cualquier longitud. En general, la longitud del PTD varía de 5 o aproximadamente 5 a 100 o aproximadamente 100 aminoácidos de longitud. Por ejemplo, la longitud del PTD puede variar de 5 o aproximadamente 5 a 25 o aproximadamente 25 aminoácidos de longitud. En algunos ejemplos, el PTD es de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos de longitud.

Un PTD individual o múltiples de los mismos se pueden conjugar con un polipéptido de u-PA modificado. Estos se emplean ventajosamente para el tratamiento de trastornos oculares u oftálmicos, tal como retinopatías diabéticas o degeneración macular, incluyendo AMD. Por ejemplo, múltiples copias del mismo PTD (por ejemplo, dímero, trímero, tetrámero,

pentámero, hexámero, heptamer, octamer, nonámero, decamero o multímero más grande) o diferentes PTD se pueden conjugar con el polipéptido de u-PA modificado.

Varias proteínas y sus derivados de peptídos poseen propiedades de internalización celular. Los PTD de ejemplo se conocen en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, PTD enumerados en la Tabla posterior, incluyendo, por ejemplo, PTD derivados del virus de inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) TAT (SEQ ID Núms:125-135; Ruben *et al*. (1989) *J. Virol.* 63:1-8), la proteína tegumento del virus del herpes VP22 (SEQ ID NO: 140; Elliott y O'Hare (1997) *Cell* 88:223-233), la proteína homeótica de la proteína Antennapedia (Antp) de *Drosophila melanogaster* (Penetratina PTD; SEQ ID NO: 112; Derossi *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* 271:18188-18193), el péptido antimicrobiano de protegrina 1 (PG-1) SynB (por ejemplo, SynB1 (SEQ ID NO: 121), SynB3 (SEQ ID NO: 122), y SynB4 (SEQ ID NO: 123); Kokryakov *et al.* (1993) *FEBS Lett*. 327:231-236) y el factor de crecimiento de fibroblastos de Kaposi (SEQ ID NO: 105; Lin *et al*., (1995) *J. Biol. Chem*. 270-14255-14258).

Se ha descubierto que otras proteínas y sus derivados de péptidos poseen propiedades de internalización celular similares. Los péptidos portadores que se han derivado de estas proteínas muestran poca homología de secuencia entre sí, pero todos son altamente catiónicos y ricos en arginina o lisina. De hecho, se ha demostrado que los péptidos de poliarginina sintéticos se internalizan con un alto nivel de eficiencia y se pueden seleccionar para la conjugación con el anticuerpo proporcionado (Futaki *et al*. (2003) *J. Mol.* Recognit. 16:260-264; Suzuki *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:5836-5840). El PTD también se puede seleccionar de entre uno o más PTD sintéticos, incluyendo pero no limitado a, transportan (SEQ ID NO: 136; Pooga *et al.* (1988) *FASEB J.* 12:67–77; Pooga *et al.* (2001) *FASEB J.* 15:1451–1453), MAP (SEQ ID NO: 103; Oehlke *et al.* (1998) *Biochim. Biophys. Acta*. 1414:127–139), KALA (SEQ ID NO: 101; Wyman *et al.* (1997) *Biochemistry* 36:3008–3017) y otros péptidos catiónicos, tal como, por ejemplo, varios péptidos β-catiónicos (Akkarawongsa *et al.* (2008) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 52(6):2120-2129). Los péptidos de PTD adicionales y los PTD variantes también se proporcionan, por ejemplo, en las publicaciones de patentes de Estados Unidos Núms. US 2005/0260756, US 2006/0178297, US 2006/0100134, US 2006/0222657, US 2007/0161595, US 2007/0129305, publicación de patente europea Núm. EP 1867661, Publicaciones PCT Núms. WO 2000/062067, WO 2003/035892, WO 2007/097561, WO 2007/053512 y Tabla 13 en la presente (posterior). Cualquiera de los PTD proporcionados en la presente o conocidos en la técnica se pueden conjugar con un anticuerpo terapéutico proporcionado.

Tabla 13: Dominios de Transducción de Proteína Conocidos		
Dominio de Transducción de Proteína (PTD)	**Fuente de Proteína**	**SEQ ID NO**
TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	Buforin II	82
RKKRRRESRKKRRRES	DPV3	83
GRPRESGKKRKRKRLKP	DPV6	84
GKRKKKGKLGKKRDP	DPV7	85
GKRKKKGKLGKKRPRSR	DPV7b	86
RKKRRRESRRARRSPRHL	DPV3/10	87
SRRARRSPRESGKKRKRKR	DPV10/6	88
VKRGLKLRHVRPRVTRMDV	DPV1047	89
VKRGLKLRHVRPRVTRDV	DPV1048	90
SRRARRSPRHLGSG	DPV10	91
LRRERQSRLRRERQSR	DPV15	92
GAYDLRRRERQSRLRRRERQSR	DPV15b	93
WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAA	GALA	94
KGSWYSMRKMSMKIRPFFPQQ	Cadena beta de fibrinógeno	95
KTRYYSMKKTTMKIIPFNRL	Precursor de cadena gamma de fibrinógeno	96
RGADYSLRAVRMKIRPLVTQ	Cadena alfa de fibrinógeno	97
LGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP	hCT(9-32)	98
TSPLNIHNGQKL	HN-1	99
NSAAFEDLRVLS	Nucleoproteína del virus de la influenza (NLS)	100
WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA	KALA	101
VPMLKPMLKE	Ku70	102
KLALKLALKALKAALKLA	MAP	103
GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	MPG	104
AAVALLPAVLLALLAP	Factor de crecimiento de fibroblastos humanos 4 (factor de crecimiento de fibroblastos Kaposi)	105
VQRKRQKLM	N50 (NLS de NF-kB P50)	106
KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	Pep-1	107
SDLWEMMMVSLACQY	Pep-7	108
RQIKIWFQNRRMKWKK	Penetratina	109
GRQIKIWFQNRRMKWKK	Variante de Penetratina	110
RRMKWKK	Penetratina Corta	111
ERQIKIWFQNRRMKWKK	Penetratina 42-58	112
RRRRRRR	Poli arginina - R7	113
RRRRRRRRR	Poli arginina - R9	114
RVIRVWFQNKRCKDKK	pISL	115
MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKP	PrPc1-28 de ratón Prion	116
LLIILRRRIRKQAHAHSK	pVEC	117

Tabla 13: Dominios de Transducción de Proteína Conocidos		
Dominio de Transducción de Proteína (PTD)	**Fuente de Proteína**	**SEQ ID NO**
LLIILRRRIRKQAHAH	Variante de pVEC	118
VRLPPPVRLPPPVRLPPP	SAP	119
PKKKRKV	SV-40 (NLS)	120
RGGRLSYSRRRFSTSTGR	SynB1	121
RRLSYSRRRF	SynB3	122
AWSFRVSYRGISYRRSR	SynB4	123
YGRKKRRQRRRPPQ	Tat 47-60	124
YGRKKRRQRRR	Tat 47-57	125
YGRKKRRQRR	Tat 47-56	126
GRKKRRQRR	Tat 48-56	127
GRKKRRQRRR	Tat 48-57	128
RKKRRQRRR	Tat 49-57	129
RKKRRQRR	Tat 49-56	130
GRKKRRQRRRPPQ	Tat 48-60	131
GRKKR	Tat 48-52	132
CFITKALGISYGRKKRRQRRRPPQFSQTHQVSLSKQ	Tat 37-72	133
FITKALGISYGRKKRRQRRRPQFSQTHQVSLSKQ	Tat 38-72	134
YGRKKRRQRRRPP	Tat 47-59	135
GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	Transportan	136
AGYLLGKINLKALAALAKKIL	Transportan 10	137
GWTLNSAGYLLG	Derivado de transportan	138
INLKALAALAKKIL	Derivado de transportan	139
DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVD	VP22	140
DPKGDPKGVTVTVTVTVTGKGDPKPD	VT5	141
GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	Basado en secuencia de señal péptido	142
KLALKLALKALKAALKLA	Anfifílico péptido de modelo	143
KFFKFFKFFK	Pared celular bacteriana permeabilidad	144
LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES	LL- 37	145
SWLSKTAKKLENSAKKRISEGIAIAIQGGPR	Cecropina P1	146
ACYCRIPACIAGERRYGTCIYQGRLWAFCC	alfa defensina	147
DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTCYRGKAKCCK	beta defensina	148
RKCRIWIRVCR	Bactenecina	149
RRRPRPPYLPRPRPPPFFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRFPGKR	PR- 39	150
ILPWKWPWWPWRR	Indolicidina	151
GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	MPS	152
PVIRRVWFQNKRCKDKK	pIs1	153

En algunos ejemplos, los PTD se pueden modificar mediante el reemplazo de una

lisina o arginina con otro aminoácido básico, tal como el reemplazo de una lisina con una arginina o mediante el reemplazo de una arginina con una lisina.

E. ENSAYOS PARA EVALUAR O MONITOREAR LA ACTIVIDAD DE u-PA EN LAS FUNCIONES MEDIADAS POR COMPLEMENTO

Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente exhiben especificidad y/o selectividad alterada para proteína C3 de complemento. Los polipéptidos de u-PA modificados de ejemplo escinden específicamente la proteína C3 de complemento y, por lo tanto, alteran la activación del complemento. Además, los polipéptidos de u-PA modificados de ejemplo proporcionados en la presente han alterado, o reducido, la especificidad y/o selectividad para la escisión de sustratos naturales de u-PA, tal como plasminógeno, y unión a uPAR.

Se pueden usar diversos ensayos *in vitro* e *in vivo* para monitorear o analizar polipéptidos de u-PA para determinar su capacidad de escindir la proteína C3 de complemento y por sus efectos en la activación del complemento y enfermedades y trastornos mediados por complemento. Estos ensayos se conocen por aquellos expertos en la técnica. Un experto en la técnica puede probar un polipéptido de u-PA particular para la escisión de la proteína C3 de complemento y/o prueba para evaluar cualquier cambio en los efectos de un u-PA en una actividad mediada por complemento en comparación con la ausencia de una proteasa. Algunos de estos ensayos se ejemplifican en la presente.

En la presente se proporcionan ensayos *in vitro* e *in vivo* de ejemplo para comparar una actividad de un polipéptido de u-PA modificado en la función de proteína C3 de complemento. Tal como se analiza posteriormente, numerosos ensayos, tal como ensayos para medir la activación del complemento, se conocen por un experto en la técnica. También se proporcionan en la presente ensayos de ejemplo para determinar la actividad de los polipéptidos de u-PA modificados para actividades de u-PA tipo silvestre, tal como escisión de plasminógeno o unión a uPAR. También se proporcionan ensayos para determinar la especificidad de los polipéptidos de u-PA modificados para proteína C3 de complemento. Posteriormente se describen ensayos de ejemplo.

1. Métodos para evaluar la actividad de u-PA en la función de proteína C3 de complemento

Una proteasa de u-PA modificada puede exhibir alteraciones en la especificidad y/o selectividad a cualquiera de una o más proteínas de complemento y, por lo tanto, inactivar cualquiera de una o más proteínas de complemento, tal como, por ejemplo, C3, en comparación con la forma de longitud completa, andamiaje o tipo silvestre correspondiente de la proteasa de u-PA modificada. Las proteasas de u-PA modificadas retienen su actividad

proteasa, pero pueden exhibir una especificidad y/o selectividad aumentada a cualquiera de una o más proteínas de complemento. Las proteasas de u-PA modificadas de ejemplo escinden específicamente cualquiera una o más proteínas de complemento, tal como, por ejemplo, C3, y por lo tanto alteran la actividad de una proteína de complemento. Todas estas proteasas de u-PA modificadas con mayor especificidad y/o selectividad a cualquiera de una o más proteínas de complemento son agentes terapéuticos candidatos.

Cuando la proteasa de u-PA modificada exhibe una especificidad y/o selectividad aumentada a cualquiera de una o más proteínas de complemento, se pueden usar ensayos *in vitro* e *in vivo* para monitorear o analizar proteasas para efectos en funciones mediadas por complemento. Estos ensayos se conocen por aquellos expertos en la técnica. Un experto en la técnica puede probar una proteasa de u-PA modificada para la escisión de cualquiera de una o más proteínas de complemento, tal como, por ejemplo, C3, y/o prueba para evaluar cualquier cambio en los efectos de una proteasa de u-PA modificada en una actividad mediada por complemento en comparación con la ausencia de una proteasa de u-PA modificada. Algunos de estos ensayos se ejemplifican en la presente.

En la presente se proporcionan ensayos *in vitro* e *in vivo* de ejemplo para comparar una actividad de una proteasa de u-PA modificada en la función de una o más proteínas de complemento dirigidas. Muchos de los ensayos son aplicables a otras proteasas y proteasas modificadas. Tal como se analizó anteriormente, los ensayos para actividades de complemento incluyen, pero no se limitan a, ensayos que miden productos de activación de la activación del complemento, tal como, por ejemplo, el complejo MAC C5b-9, y la generación de uno o más productos de escisión de complemento tal como C4a, C5a, C3b y C3d. Los ensayos para medir la activación del complemento también incluyen ensayos funcionales que miden la actividad funcional de componentes específicos de las vías de complemento, tal como, por ejemplo, ensayos hemolíticos utilizados para medir la activación de cualquiera de las vías clásicas, lectinas o alternativas. Los ensayos para evaluar los efectos de proteasas y proteasas modificadas sobre proteínas delcomplemento y/o funciones mediadas por complemento incluyen, pero no se limitan a, análisis SDS seguido de tinción con Transferencia Western o Azul Brillante de Coomassie, inmunoensayos enzimáticos y ensayos hemolíticos. En un ejemplo, los ensayos *in vitro* se pueden realizar usando proteínas de complemento purificadas. En otro ejemplo, los ensayos *in vivo* se pueden realizar analizando el suero de una especie, que incluye especies humanas o mamíferas, para la activación funcional de complemento. Posteriormente se describen ensayos de ejemplo.

En un ejemplo, los ensayos *in vitro* se pueden realizar usando proteína de complemento purificada C3, como se ejemplifica en el Ejemplo 2-4. En otro ejemplo, los

ensayos *in vitro* se pueden llevar a cabo en soluciones fisiológicamente relevantes (*es decir,* humor vítreo), como se ejemplifica en el Ejemplo 5. En otro ejemplo, los ensayos *in vitro* se pueden realizar usando bibliotecas de péptidos para evaluar la especificidad de escisión. En otro ejemplo, se pueden realizar ensayos para evaluar las funciones normales de los polipéptidos de u-PA modificados, *es decir,* actividad hacia sustratos normales. Se pueden usar diversos modelos de enfermedad conocidos por un experto en la técnica para evaluar la eficacia de polipéptidos de u-PA proporcionados en la presente en diversas enfermedades y trastornos mediados por complemento.

a. Detección de proteínas

La detección de proteínas es un medio para medir los componentes individuales de complemento en una muestra. Las proteínas de complemento se pueden detectar para evaluar directamente los efectos de un polipéptido de u-PA en la escisión de la proteína C3 de complemento, o alternativamente, las proteínas de complemento se pueden medir como un medio para evaluar la activación del complemento. La proteína C3 de complemento, tratada en la presencia o ausencia de un polipéptido de u-PA, se puede analizar mediante uno o más ensayos que incluyen SDS-PAGE seguido de tinción con Coomassie o Transferencia Western, inmunoensayo enzimático, inmunohistoquímica, citometría de flujo, nefelometría, difusión de gel de agar o inmunodifusión radial. Posteriormente se describen ensayos de ejemplo para detección de proteína.

i. Análisis SDS-PAGE

El análisis de proteínas de complemento en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de un polipéptido de u-PA se puede realizar mediante el análisis de proteínas en SDS-PAGE seguido de la detección de esas proteínas. En estos ejemplos, las proteínas de complemento se pueden detectar mediante tinción para proteína total, tal como por tinción con Azul Brillante de Coomassie, tinción Silver, o por cualquier otro método conocido por un experto en la técnica, o por Transferencia Western usando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para una proteína específica. Habitualmente, una proteína de complemento purificada, tal como, por ejemplo, proteína C3 de complemento, se puede incubar en la presencia o ausencia de un polipéptido de u-PA. La proteína de complemento tratada se puede volver a disolver en un gel SDS-PAGE seguido por un método para detectar proteína en el gel, por ejemplo, mediante tinción con Azul Brillante de Coomasie. La proteína tratada se puede comparar con su proteína de longitud completa cognada y se pueden determinar los productos de degradación formados por la escisión de proteasa de la proteína.

En otra modalidad, una muestra, tal como, por ejemplo, suero o plasma humano,

se puede tratar en la presencia o ausencia de un polipéptido de u-PA o se puede recolectar después del tratamiento de un animal o un humano con o sin un polipéptido de u-PA. La muestra tratada con u-PA se puede analizar en SDS-PAGE y se puede detectar una proteína de complemento específica, tal como, por ejemplo, C3, C5 o Factor B, mediante Transferencia Western usando anticuerpos monoclonales o policlonales contra la proteína. La escisión de la proteína de complemento se puede comparar con una muestra que no se trató con un polipéptido de u-PA. Adicionalmente, la muestra se puede estimular para iniciar la activación del complemento tal como mediante incubación con IgG que estimula la activación de la vía clásica o mediante LPS que estimula la activación de la vía alternativa. La muestra se puede volver a disolver mediante SDS-PAGE para la detección de cualquiera de una o más de las proteínas de complemento nativas para determinar la presencia o ausencia de productos de escisión de una proteína específica en comparación con una muestra de la proteína no tratada con un polipéptido de u-PA. En estos ejemplos, las moléculas efectoras de escisión de proteínas de complemento nativas también se pueden analizar mediante Transferencia Western usando anticuerpos monoclonales y policlonales para evaluar la activación de una o más de las vías de complemento. Ejemplos de moléculas efectoras de complemento pueden incluir, pero no se limitan a, C3a, C3d, iC3b, Bb y C5-b9. Por ejemplo, la expresión disminuida en una muestra de Bb puede indicar que un polipéptido de u-PA inhibió la activación de la vía alternativa de complemento. Los productos de escisión de las moléculas efectoras también se pueden determinar para evaluar los efectos de concentraciones crecientes de un polipéptido de u-PA en la escisión de moléculas efectoras de complemento mismas.

ii. Inmunoensayo enzimático

El inmunoensayo enzimático (EIA; también llamado ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas; ELISA) es un ensayo utilizado para medir la presencia de una proteína en una muestra. Habitualmente, la medición de la proteína es una medición indirecta de la unión de la proteína a un anticuerpo, que en sí mismo se etiqueta químicamente con un sustrato detectable tal como una enzima o compuesto fluorescente. Se pueden usar ensayos de EIA para medir los efectos de polipéptidos de u-PA en la activación del complemento mediante la medición de la presencia de una molécula efectora de complemento generada después de la activación del complemento. En estos ejemplos, una muestra, tal como, por ejemplo, suero o plasma humano, se puede pretratar en la presencia o ausencia de concentraciones crecientes de un polipéptido de u-PA y luego se puede activar para inducir la activación del complemento mediante incubación con moléculas de inicio, o se puede recolectar después del tratamiento de un animal o un humano con un polipéptido de u-PA. Por ejemplo, la vía clásica se puede activar mediante incubación con IgG y la vía alternativa se puede activar mediante incubación

de la muestra con LPS. Un ensayo de activación del complemento específico para la vía de lectina requiere que la vía clásica de complemento se inhiba ya que la actividad de escisión C4/C2 de la vía de lectina se comparte con la vía clásica de complemento. La inhibición de la vía clásica se puede lograr usando un amortiguador de alta resistencia iónica que inhibe la unión de C1q a complejos inmunitarios e interrumpe el complejo C1, mientras que un amortiguador de alta resistencia iónica no afecta la actividad de unión a carbohidratos de MBL. En consecuencia, la activación de la vía de lectina se puede inducir mediante incubación de una muestra, tal como suero o plasma humano, con una superficie recubierta de mannan en la presencia de NaCl 1 M.

Después de la activación, la muestra se puede inactivar con la adición de Pefabloc (Roche) y EDTA para minimizar la activación continua de las vías. Las muestras se pueden analizar para detectar la presencia de moléculas efectoras de complemento mediante un ensayo EIA o ELISA. Los ensayos EIA y ELISA para medir proteínas de complemento son bien conocidos por un experto en la técnica. Cualquier producto de activación del complemento se puede evaluar. Productos de activación del complemento de ejemplo para la medición de la activación del complemento incluyen iC3b, Bb, C5b-9, C3a, C3a-desArg y C5a-desArg. La vía de complemento activada se puede determinar dependiendo del producto de activación del complemento medido. Por ejemplo, la medición del producto de escisión de Bb es un marcador individual de la vía alternativa.

En algunos ejemplos, el EIA se puede emparejar con detección de las proteínas de complemento escindidas mediante análisis de la muestra estimulada por complemento tratada con proteasa mediante SDS-PAGE seguida de análisis de Transferencia Western para la identificación de componentes de complemento específicos. Usando software de densitometría, la escisión del producto de complemento se puede comparar con el componente de complemento de longitud completa escindido a lo largo del ensayo y se puede determinar la apariencia de todos los productos de degradación principales y el porcentaje de escisión.

iii. Inmunodifusión radial (RID)

La inmunodifusión radial (RID) es una técnica que se basa en la precipitación de complejos inmunitarios formados entre anticuerpos incorporados en geles de agarosa cuando se vierte, y antígeno presente en una muestra de prueba que resulta en una línea de precipitación circular alrededor del pocillo de muestra. El diámetro del anillo de precipitina es proporcional a la concentración del anticuerpo (o antígeno) presente en la muestra de prueba. Al comparar el diámetro del anillo de precipitina de muestra de prueba con estándares conocidos, se puede lograr una estimación relativamente insensible de la concentración de

anticuerpo o antígeno específico. Se puede usar RID para medir la cantidad de una proteína de complemento en una muestra. Por ejemplo, una muestra tal como, por ejemplo, suero o plasma humano, se puede tratar en la presencia o ausencia de concentraciones crecientes de un polipéptido de u-PA. La muestra tratada con proteasa se puede agregar a un pocillo de un gel de agarosa que se ha hecho para incorporar un anticuerpo policlonal o monoclonal contra cualquiera de las proteínas de complemento, tal como incluyendo, pero no limitado a, C3, C5, C6, C7, C9 o Factor B. Después de la remoción de proteínas no precipitadas por exposición a NaCl 0.15 M, los anillos de proteína precipitados se pueden evaluar mediante tinción con un tinte de proteína, tal como, por ejemplo, Azul Brillante de Coomassie o tinción doble de Crowles.

b. Ensayos hemolíticos

Los ensayos hemolíticos funcionales proporcionan información sobre la función de complemento como un todo. Este tipo de ensayo utiliza eritrocitos de ovino sensibilizados o no sensibilizados con anticuerpos. Los ensayos hemolíticos incluyen el ensayo de complemento hemolítico total (CH50), que mide la capacidad de la vía clásica y el MAC para lisar un RBC ovino. Depende de la activación secuencial de los componentes de vía clásica (C1 a C9) para lisar eritrocitos ovinos que se han sensibilizado con cantidades óptimas de anticuerpos de eritrocitos anti-ovino de conejo para producir complejos de antígeno-anticuerpo celular. Los ensayos hemolíticos también pueden incluir un ensayo CH50 de vía alternativa (CH50 de conejo o APCH50), que mide la capacidad de la vía alternativa y el MAC para lisar un RBC de conejo. Una unidad de CH50 y/o APCH50 se define como la cantidad o dilución de suero necesaria para lisar el 50% de los células rojas en el ensayo. Habitualmente, para evaluar la activación del complemento, una muestra, tal como, por ejemplo, suero o plasma humano, se puede tratar en la presencia o ausencia de concentraciones crecientes de un polipéptido de u-PA, o se puede recolectar después del tratamiento de un animal o humano en la presencia o ausencia de un polipéptido de u-PA. La muestra tratada con proteasa se puede mezclar posteriormente con células rojas de ovino que se han activado o sensibilizado con IgG. Una muestra de agua solo mezclada con células rojas de ovino puede actuar como un control de lisis total para evaluar con precisión el porcentaje de lisis de las muestras analizadas. La adición de NaCl 0.15M a la muestra se puede agregar para detener la reacción de lisis. La lisis de las células rojas, inducida por la activación de los componentes terminales de la vía de complemento, se puede evaluar midiendo la liberación de hemoglobina. La medición se puede realizar mediante lecturas de densidad óptica (OD) de las muestras usando un espectrofotómetro a una OD de 415 nm.

En una modalidad, se pueden usar ensayos hemolíticos de dilución limitantes para

medir la actividad funcional de componentes específicos de cualquiera de las vías. En este ensayo, se utiliza una fuente de suero que tiene un exceso de todos los componentes de complemento, pero es deficiente para el que se mide en la muestra, *es* decir, un medio o fuente de suero carece de complemento para una proteína específica. Por lo tanto, el alcance de la hemólisis depende de la presencia del componente medido en la muestra de prueba. En este ensayo, una proteína de complemento purificada, tal como, por ejemplo, cualquiera de las proteínas de complemento nativas que incluyen, pero no se limitan a C3, se puede incubar en la presencia o ausencia de concentraciones crecientes de un polipéptido de u-PA. La proteína de complemento purificada tratada con proteasa luego se puede mezclar con medio o plasma que carece de complemento y células rojas de ovino activadas por IgG y la hemólisis de la muestra se puede evaluar como se describió anteriormente. En otra modalidad, la escisión de proteasa se puede correlacionar con la activación del complemento mediante ensayo de actividad hemolítica de una muestra tratada con proteasa y, posteriormente, analizar la muestra en gel SDS-PAGE seguido de tinción con una tinción de proteína, tal como, por ejemplo, Azul de Coomassie. La proteína de complemento purificada tratada con las proteasas se puede evaluar para determinar la escisión y el porcentaje de componente de complemento de longitud completa escindido a lo largo del ensayo y se puede calcular la apariencia de todos los productos de degradación principales. De manera alternativa, el análisis de la proteína de complemento tratada con proteasa se puede realizar mediante Transferencia Western.

Una alternativa al ensayo hemolítico, llamado inmunoensayo de liposomas (LIA), se puede usar para evaluar la activación de la vía clásica. El LIA (Waco Chemicals USA, Richmond, Va.) utiliza liposomas recubiertos con dinitrofenilo (DNP) que contienen la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Cuando el suero se mezcla con los liposomas y un sustrato que contiene anticuerpo anti-DNP, glucosa-6-fosfato y dinucleótido de nicotinamida adenina, se produce una lisis de liposomas activados y una reacción colorimétrica enzimática que es proporcional a la actividad total clásica de complemento.

c. Métodos para determinar los sitios de escisión

Las secuencias de escisión en la proteína C3 de complemento se pueden identificar por cualquier método conocido en la técnica (ver, por ejemplo, Publicación de Estados Unidos No. US 2004/0146938). En un ejemplo, una secuencia de escisión se determina incubando proteína C3 de complemento con cualquier polipéptido de u-PA modificado proporcionado en la presente. Después de la incubación con el polipéptido de u-PA, la proteína C3 se puede separar mediante SDS-PAGE y los productos degradantes se pueden identificar mediante tinción con un tinte de proteína tal como Azul Brillante de

Coomassie. Los fragmentos proteolíticos se pueden secuenciar para determinar la identidad de las secuencias de escisión. Después de la identificación, se pueden usar sustratos de péptidos fluorogénicos diseñados en función de la secuencia de escisión de un sustrato diana deseado para evaluar la actividad, como se describe a continuación.

2. Métodos para evaluar la actividad de u-PA tipo silvestre

Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente han alterado, o reducido, la especificidad para plasminógeno y polipéptidos de uPAR. Los polipéptidos de u-PA se pueden analizar para determinar si retienen eficiencia catalítica y/o especificidad de sustrato para su plasminógeno de sustrato nativo. Por ejemplo, la escisión de plasminógeno se puede evaluar mediante la incubación de un polipéptido de u-PA con plasminógeno y la detección de productos de escisión de proteínas. En otro ejemplo, la escisión de plasminógeno se puede determinar *in vitro* midiendo la escisión de un tetrapéptido etiquetado fluorogénicamente del sustrato peptídico, por ejemplo, un sustrato fluorogénico, tal como fluoróforos ACC (7-amino-4-carbamoilmetilcumarina) o AMC (7-amino-4-metilcumarina) elazados a un sustrato de tetrapéptido. En algunos ejemplos, los ensayos de activación de plasminógeno se utilizan para determinar la especificidad de los polipéptidos de u-PA proporcionados en la presente. En otros ejemplos, se determina la capacidad de los polipéptidos de u-PA proporcionados en la presente para unirse al receptor de u-PA (uPAR).

a. Escisión de plasminógeno

En un ejemplo, los polipéptidos de u-PA modificados se pueden analizar usando sustratos de péptidos fluorogénicos individuales correspondientes a la secuencia de escisión deseada. Por ejemplo, un método para evaluar una proteasa de u-PA modificada que puede escindir cualquiera de una o más de las secuencias de escisión deseadas incluye: (a) poner en contacto una muestra fluorogénica de péptido (que contiene una secuencia de escisión diana deseada) con una proteasa, de tal manera que se libera una porción fluorogénica de una secuencia de sustrato de péptido tras la acción de la proteasa, produciendo de esta manera una porción fluorescente; y (b) observar si la muestra experimenta un cambio detectable en la fluorescencia, el cambio detectable es una indicación de la presencia de la proteasa enzimáticamente activa en la muestra. En este ejemplo, la secuencia de escisión deseada se hace en un péptido fluorogénico por métodos conocidos en la técnica. En una modalidad, las secuencias individuales de escisión de péptido se pueden unir a un sustrato etiquetado fluorogénicamente, tal como, por ejemplo, un grupo saliente fluorogénico de ACC o AMC, y la liberación de la porción fluorogénica se puede determinar como una medida de especificidad de una proteasa para una secuencia de escisión de péptido. La velocidad de aumento en la fluorescencia de la secuencia de escisión diana se puede medir tal como

mediante el uso de un espectrofotómetro de fluorescencia. La velocidad de aumento en fluorescencia se puede medir con el tiempo. Las constantes cinéticas de Michaelis-Menton se pueden determinar por los métodos cinéticos estándar. Las constantes cinéticas k_{cat}, K_m y k_{cat}/K_m se pueden calcular graficando el inverso de la concentración del sustrato versus el inverso de la velocidad de escisión del sustrato, y ajustándose a la ecuación de Lineweaver-Burk ($1/velocidad=(K_m/V_{max})(1/[S]) + 1/V_{max}$; donde $V_{max}=[ET]k_{cat}$). La constante de velocidad de segundo orden o constante de especificidad (k_{cat}/K_m) es una medida de qué tan bien se corta un sustrato por una proteasa particular. Por ejemplo, un tetrapéptido de ACC o AMC tal como Ac-CPGR-AMC se puede producir e incubar con un polipéptido de u-PA modificado proporcionado en la presente y la actividad del polipéptido de u-PA se puede evaluar mediante ensayo para la liberación de la porción fluorogénica. La elección del tetrapéptido depende de la secuencia de escisión deseada para dirigirse y se puede determinar empíricamente.

En otras modalidades, los polipéptidos de u-PA también se pueden analizar para determinar que, cuando se encuentran en una forma activa, escinden la secuencia deseada cuando se presentan en el contexto de la proteína de longitud completa. En un ejemplo, una proteína diana purificada, *es* decir, plasminógeno, se puede incubar en la presencia o ausencia de un polipéptido de u-PA seleccionado y el evento de escisión se puede monitorear mediante SDS-PAGE seguido de tinción con Azul Brillante de Coomassie para proteína y análisis de productos de escisión usando densitometría.

b. Ensayos de activación de plasminógeno

Se puede usar cualquier ensayo conocido por un experto en la técnica para determinar si los polipéptidos de u-PA activan plasminógeno. En un ejemplo, la activación de plasminógeno se puede determinar incubando los polipéptidos en la presencia de plasminógeno y un sustrato de plasmina detectable, tal como, por ejemplo, el sustrato cromogénico H- D-Val-Leu-Lys-p-nitroanaluro (Chromogenix S-2251) o el sustrato fluorogénico H-D-Val-Leu-Lys-7-amido-4-metilcumarina. La hidrólisis se monitorea después midiendo la absorbancia a 405 nm o detectando fluorescencia usando un lector de placas de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 390 nm y una longitud de onda de emisión de 480 nm. En otro ejemplo, la activación de plasminógeno se evalúa mientras que los polipéptidos de u-PA se unen a uPAR. En este ejemplo, los polipéptidos u-PA se unen primero a uPAR en una superficie celular, tal como una célula U397, seguido por la adición de plasminógeno y un sustrato de plasmina detectable y la hidrólisis se mide como se describió anteriormente.

c. Ensayos de unión u-PA-uPAR

La unión de los polipéptidos de u-PA a uPAR se puede evaluar por cualquier

ensayo conocido por un experto en la técnica para detectar interacciones de unión a proteína-proteína, incluyendo, pero no limitado a, ensayos de unión de fase sólida, ELISA, resonancia de plasmón superficial y FACS. En un ejemplo, se puede usar ELISA. El uPAR recombinante se inmoviliza en una placa de microtitulación y la unión de polipéptido de u-PA se evalúa mediante la adición de un reactivo que se une específicamente a u-PA, tal como, por ejemplo, un anticuerpo de unión a u-PA. En otro ejemplo, la unión se puede determinar en un ensayo basado en células usando una línea celular, tal como, por ejemplo, células U397, que expresa el receptor de u-PA. Los polipéptidos de u-PA se pueden etiquetar, por ejemplo, con un sustrato cromogénico, fluorogénico o radiactivo para efectuar la detección de unión.

d. Escisión de C3

La actividad de los polipéptidos de uPA modificados se puede evaluar mediante escisión de la proteína C3 de complemento de sustrato humana mediante la medición de la cantidad de C3 humana intacta restante después de la incubación con diversas concentraciones de la proteasa de uPA modificada. De acuerdo con este ensayo, la señal se genera en la presencia de C3 humano intacto, y se pierde a medida que la C3 se escinde. En otros ejemplos, los ensayos de activación de C3 se utilizan para determinar la especificidad de los polipéptidos de uPA modificados proporcionados en la presente.

La proteína C3 purificada se puede incubar con los polipéptidos de u-PA modificados y los niveles residuales de C3 humana no digerida se pueden cuantificar por cualquier ensayo conocido en la técnica para evaluar la concentración de proteína, tal como, por ejemplo, usando un tamiz de ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificada (AlphaScreen®; Perkin Elmer). La mezcla de polipéptido de C3/ uPA se incuba con cuentas aceptoras recubiertas de IgG de αratón y, después de la incubación, la mezcla de mAb/cuentas aceptoras αde -hC3 se incuba con un pAb de α-hC3 biotinilado. Se adicionan cuentas donantes recubiertas de estreptavidina a la mezcla y después se mide la señal de 'alphascreen' (Excitación = 680 nm, Emisión = 570 nm). Esta señal corresponde a la concentración de proteína C3 restante. Se puede calcular la concentración de polipéptido de uPA necesaria para escindirse a través del 50% del hC3 (EC_{50}) disponible.

ACC-AGR + ELISA

Se proporcionan en la presente métodos para evaluar la especificidad de sustrato de los polipéptidos de u-PA modificados. El uso de un sustrato de péptido fluorogénico, tal como, por ejemplo, un sustrato de péptido fluorogénico de 7-amino-4-metilcumarina (AMC) o un sustrato de péptido fluorogénico de 7-amino-4-carbamoilmetilcumarina (ACC), se puede usar para evaluar la actividad de una proteasa modificada mediante la cual una porción fluorogénica se libera de un sustrato de péptido luego de la acción de la proteasa, y la

liberación de la porción fluorogénica se puede determinar como una medida de especificidad de una proteasa para una secuencia de escisión de péptido. La velocidad de aumento en la fluorescencia de una secuencia de escisión de sustrato no diana o secuencia de escisión diana se puede medir tal como mediante el uso de un espectrofotómetro de fluorescencia. La velocidad de aumento en fluorescencia se puede medir con el tiempo. Las constantes cinéticas de Michaelis-Menton se pueden determinar por los métodos cinéticos estándar. Las constantes cinéticas k_{cat}, K_m y k_{cat}/K_m se pueden calcular graficando el inverso de la concentración del sustrato versus el inverso de la velocidad de escisión del sustrato, y ajustándose a la ecuación de Lineweaver-Burk ($1/velocidad=(K_m/V_{max})(1/[S]) + 1/V_{max}$; donde $V_{max}=[ET]k_{cat}t$). La constante de especificidad (k_{cat}/K_m) es una medida de qué tan bien se corta un sustrato por una proteasa particular.

En un ejemplo, cualquiera de una o más de las secuencias de escisión de una proteína de complemento se pueden determinar y usar como una secuencia de escisión diana deseada. Por ejemplo, cualquiera de una o más de las secuencias de escisión de C3. En otro ejemplo, se puede usar una secuencia que corresponde a un sustrato de la proteasa tipo silvestre para evaluar la actividad de proteasa residual.

En una modalidad adicional, se puede usar una proteína de complemento de longitud completa como un sustrato diana para evaluar la especificidad de proteasa en comparación con un sustrato diana nativo de longitud completa de una proteasa. Además, se puede usar una proteína de complemento de longitud completa para evaluar la correlación entre la especificidad del sustrato y la escisión mediante una proteasa de un sustrato diana de longitud completa versus una secuencia de escisión de sustrato de cuatro aminoácidos P1-P4 contenida dentro del sustrato diana. En un ejemplo, una proteína C3 de longitud completa se puede usar como una diana de escisión deseada de cualquiera de una o más de las proteasas para evaluar la especificidad. En este ejemplo, la escisión de C3 por una proteasa modificada se puede comparar con la escisión de otro sustrato de longitud completa, o la escisión se puede comparar con una secuencia de escisión de tetrapéptido fluorogénico de C3. La constante de especificidad de escisión de una proteína de longitud completa por una proteasa se puede determinar mediante el uso de densitometría en gel para evaluar cambios en la densitometría a lo largo del tiempo de una banda de sustrato diana de longitud completa incubada en presencia de una proteasa.

En una modalidad adicional, la actividad de un polipéptido de u-PA modificado se puede evaluar después de incubación prolongada en plasma de cynomolgus o humor vítreo. En un ejemplo, la actividad de proteasa residual se evalúa con sustrato fluorogénico AGR-ACC (7-amino-4-carbamoilmetil-coumarina) después de la incubación en 80% de humor vítreo

de Cynomolgus. Por ejemplo, el polipéptido de u-PA modificado de SEQ ID NO:21 exhibe una capacidad comparable para escindir el sustrato fluorogénico AGR-ACC después de 7 días de incubación en vítreo y PBS. En otro ejemplo, el polipéptido de u-PA modificado de SEQ ID NO:21 escinde el sustrato fluorogénico AGR-ACC a niveles similares antes y después de 7 días de incubación en humor vítreo.

Evaluación de especificidad usando bibliotecas de péptidos

Se proporcionan en la presente métodos para evaluar la especificidad de sustrato de los polipéptidos de u-PA modificados resultantes usando bibliotecas de péptidos acopladas a péptidos fluorogénicos. Un polipéptido de u-PA modificado se puede verificar para determinar la especificidad del sustrato de P1-P4 en cualquier subsitio dado usando una biblioteca de péptidos acoplada a un sustrato fluorogénico (Harris *et al*., (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 97*:7754; US 2004/0175777; US 2004/0146938). El uso de una biblioteca de péptidos o bibliotecas de péptidos permite la determinación rápida y fácil del sustrato proteolítico. Esta estrategia implica el uso de bibliotecas de péptidos mediante las cuales una posición en la biblioteca se mantiene constante (*es decir,* la posición P1), mientras que las posiciones restantes (*es decir,* P4-P2 y/o P1'y/o P2') están compuestas por todas las combinaciones de aminoácidos utilizadas para preparar la biblioteca. El uso de una biblioteca de sustrato de péptido fluorogénico combinatoria, tal como, por ejemplo, un sustrato de péptido fluorogénico de 7-amino-4-metilcumarina (AMC) o un sustrato de péptido fluorogénico de 7-amino-4-carbamoilmetilcumarina (ACC), se puede usar para evaluar la actividad de una proteasa modificada mediante la cual una porción fluorogénica se libera de un sustrato de péptido luego de la acción de la proteasa. Los expertos en la técnica apreciarán que estos métodos proporcionan una amplia variedad de formatos de biblioteca alternativos. En un ejemplo, una proteasa se puede perfilar con una biblioteca diversa-P1. Una biblioteca de tetrapéptidos diversa-P1 contiene tetrapéptidos fluorogénicos ACC o AMC mediante los cuales la posición P1 se mantiene sistemáticamente constante mientras que las posiciones P2, P3 y P4 contienen una mezcla equimolar de cualquiera de uno o más de 15 aminoácidos. La determinación y consideración de limitaciones particulares relevantes para cualquier enzima o método particular de determinación de especificidad de secuencia de sustrato se encuentran dentro de la capacidad de aquellos expertos en la técnica.

Los expertos en la técnica reconocen que existen muchos métodos para preparar los péptidos. En una modalidad de ejemplo, la biblioteca de sustrato se analiza mediante la unión de un sustrato etiquetado fluorogénicamente a un soporte sólido. En un ejemplo, el grupo saliente fluorogénico del péptido de sustrato se sintetiza mediante la condensación de un derivado de cumarina de N-Fmoc, en ligador de Rink lábil a ácido para proporcionar resina

de ACC (Backes *et al*., (2000) *Nat Biotechnol*. 18:187). La remoción de Fmoc produce una amina libre. Los aminoácidos naturales, no naturales y modificados se pueden acoplar a la amina, que se puede elaborar mediante el acoplamiento de aminoácidos adicionales. En una modalidad alternativa, el grupo saliente fluorogénico puede ser 7-amino-4-metilcumarina (AMC) (Harris *et al*., (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 97*:7754). Después de que se completa la síntesis del péptido, el conjugado de porción péptido-fluorogénico se puede escindir del soporte sólido o, de manera alternativa, el conjugado puede permanecer atado al soporte sólido.

Habitualmente, un método para preparar un péptido fluorogénico o un material que incluye un péptido fluorogénico incluye: (a) proporcionar un primer conjugado que contiene una porción fluorogénica unida covalentemente a un soporte sólido; (b) poner en contacto el primer conjugado con una primera porción de aminoácido protegido y un agente activador, formando de esta manera un enlace peptídico entre un grupo carboxilo y el nitrógeno amina del primer conjugado; (c) desproteger, formando de esta maera un segundo conjugado que tiene una porción amina reactiva; (d) poner en contacto el segundo conjugado con un segundo aminoácido protegido y un agente activador, formando de esta manera un enlace peptídico entre un grupo carboxilo y la porción amina reactiva; y (e) desproteger, formando de esta manera un tercer conjugado que tiene una porción amina reactiva. En una modalidad de ejemplo, el método incluye además: (f) poner en contacto el tercer conjugado con un tercer aminoácido protegido y un agente activador, formando de esta manera un enlace peptídico entre un grupo carboxilo y la porción amina reactiva; y (e) desproteger, formando de esta manera un cuarto conjugado que tiene una porción amina reactiva.

Para los aminoácidos que son difíciles de acoplar (*por ejemplo,* Ile, Val, etc.), la amina libre sin reaccionar puede permanecer en el soporte y complicar las operaciones posteriores de síntesis y ensayo. Un paso de taponamiento especializado que emplea el éster activo de 3-nitrotriazol del ácido acético en DMF acila eficientemente la anilina restante. La cumarina taponeada de ácido acético resultante que puede estar presente en la solución de secuencia de sustrato no purificada en general no es una secuencia de sustrato de proteasa.

La síntesis de péptidos de fase sólida en la que el aminoácido de extremo C de la secuencia se une a un soporte insoluble seguido de la adición secuencial de los aminoácidos restantes en la secuencia es un método de ejemplo para preparar la estructura principal de péptido de los polipéptidos proporcionados en la presente. Técnicas para síntesis de fase sólida se describen por Narany y Merrifield, Síntesis de péptidos de fase sólida; pp.3-284 en los péptidos: Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 2; Special Methods in Peptide Synthesis, Part A., Gross and Meienhofer, eds. Academic press, N.Y., (1980); y Stewart *et al.*, (1984) Solid

Phase Peptide Synthesis, 2nd ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. La síntesis de fase sólida se logra más fácilmente con sintetizadores de péptidos comercialmente disponibles que utilizan Fmoc o química t-BOC.

Por ejemplo, la síntesis de péptidos se puede realizar usando química de síntesis de Fmoc bien conocida. Por ejemplo, las cadenas laterales de Asp, Ser, Thr y Tyr se protegen usando t-butilo y la cadena lateral de residuo Cys usando S-tritilo y S-t-butiltio, y los residuos Lys se protegen usando t-Boc, Fmoc y 4-metiltritilo. Los reactivos de aminoácidos adecuadamente protegidos están disponibles comercialmente o se pueden preparar utilizando métodos reconocidos por la técnica. El uso de múltiples grupos protectores permite el desbloqueo selectivo y el acoplamiento de un fluoróforo a cualquier cadena lateral deseada particular. Por lo tanto, por ejemplo, la desprotección de t-Boc se logra usando TFA en diclorometano. La desprotección de Fmoc se logra usando, por ejemplo, 20% (v/v) piperidina en DMF o N-metilpirolidona, y la desprotección de 4-metiltritilo se logra usando, por ejemplo, 1 a 5% (v/v) TFA en agua o 1% TFA y 5% triisopropilsilano en DCM. La desprotección A-t-butiltio se logra usando, por ejemplo, mercaptoetanol acuoso (10%). La remoción de grupos t-butilo, t-boc y S-tritilo se logra usando, por ejemplo, TFA:fenol:agua:tio-aniso:etanoditio (85:5:5:2.5:2.5), o TFA:fenol:agua (95:5:5). La diversidad en cualquier posición particular o combinación de posiciones se puede introducir usando una mezcla de al menos dos, seis, 12, 20 o más aminoácidos para hacer crecer la cadena de péptidos. Las mezclas de aminoácidos pueden incluir cualquier cantidad útil de un aminoácido particular en combinación con cualquier cantidad útil de uno o más aminoácidos diferentes. En una modalidad, la mezcla es una mezcla isocinética de aminoácidos (una mezcla en relaciones adecuadas para permitir una reactividad molar igual de todos los componentes). Las proteasas modificadas, tal como, por ejemplo, una proteasa de u-PA modificada descrita en la presente, se pueden analizar usando sustratos de péptidos fluorogénicos individuales correspondientes a una secuencia de escisión deseada. Un método para evaluar una proteasa modificada que puede escindir cualquiera de una o más de las secuencias de escisión de C3 incluye: (a) poner en contacto una muestra fluorogénica de péptido (que contiene una secuencia de escisión de C3) con una proteasa, de tal manera que se libera una porción fluorogénica de una secuencia de sustrato de péptido tras la acción de la proteasa, produciendo de esta manera una porción fluorescente; y (b) observar si la muestra experimenta un cambio detectable en la fluorescencia, el cambio detectable es una indicación de la presencia de la proteasa enzimáticamente activa en la muestra. En tal ejemplo, un tetrapéptido de ACC o AMC tal como Ac-AGR-AMC se puede producir e incubar con una proteasa modificada y la actividad de la proteasa se puede evaluar mediante ensayo para la liberación de la porción fluorogénica.

La evaluación de una proteasa en una solución simplemente requiere agregar una cantidad de la solución madre de una proteasa a un péptido indicador de proteasa fluorogénica y medir el aumento posterior en la fluorescencia o disminución en la banda de excitación en el espectro de absorción. La solución y el indicador fluorogénico también se pueden combinar y analizar en un “amortiguador de digestión” que optimiza la actividad de la proteasa. Los amortiguadores adecuados para evaluar la actividad de proteasa se conocen por aquellos expertos en la técnica. En general, se selecciona un amortiguador con un pH que corresponde al pH óptimo de la proteasa particular. Por ejemplo, un amortiguador particularmente adecuado para evaluar la actividad de elastasa contiene fosfato de sodio 50 mM, EDTA 1 mM a pH 8.9. La medición se realiza más fácilmente en un fluorómetro, un instrumento que proporciona una fuente de luz de “excitación” para el fluoróforo y luego mide la luz emitida posteriormente a una longitud de onda particular. La comparación con una solución indicadora de control que carece de proteasa proporciona una medida de la actividad de proteasa. El nivel de actividad se puede cuantificar con precisión mediante la generación de una curva estándar para la combinación de proteasa/indicador en la que se determina la velocidad de cambio en la fluorescencia producida por soluciones de proteasa de actividad conocida.

Si bien la detección de compuestos fluorogénicos se puede lograr usando un fluorómetro, la detección también se puede lograr por una variedad de otros métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Por lo tanto, por ejemplo, cuando los fluoróforos se emiten en las longitudes de onda visibles, la detección puede ser simplemente por inspección visual de fluorescencia en respuesta a la excitación por una fuente de luz. La detección también se puede realizar mediante un sistema de análisis de imágenes que utiliza una cámara de video interconectada a un digitalizador u otro sistema de adquisición de imágenes. La detección también puede ser mediante visualización a través de un filtro, como bajo un microscopio de fluorescencia. El microscopio puede proporcionar una señal que es simplemente visualizada por el operador. De manera alternativa, la señal se puede grabar en una película fotográfica o usando un sistema de análisis de video. La señal también se puede cuantificar simplemente en tiempo real utilizando ya sea un sistema de análisis de imágenes o un fotómetro.

Por lo tanto, por ejemplo, un ensayo básico para la actividad de proteasa de una muestra implica suspender o disolver la muestra en un amortiguador (al pH óptimo de la proteasa particular que se está evaluando) o en una condición de prueba (*por ejemplo,* humor vítreo o suero), agregar al amortiguador un indicador de péptido de proteasa fluorogénico y monitorear el cambio resultante en fluorescencia usando un espectrofluorómetro como se muestra en, *por* ejemplo., Harris *et al*., (1998) *J Biol Chem* 273:27364. El espectrofluorómetro

se establece para excitar el fluoróforo en la longitud de onda de excitación del fluoróforo. El indicador de proteasa fluorogénica es una secuencia de sustrato de una proteasa que cambia en fluorescencia debido a una proteasa que escinde el indicador.

Las proteasas modificadas también se evalúan para determinar que escinden la secuencia deseada cuando se presentan en el contexto de la proteína de longitud completa. Las proteínas de sustrato diana que contienen sitios de escisión de C3 se encuentran en la escisión de activación de C3 o sitios activos. Los métodos para evaluar la escisión de una proteína diana se describen en la presente y/o son bien conocidos en la técnica. En un ejemplo, una proteína de complemento purificada, por ejemplo, C3, se puede incubar en la presencia o ausencia de una proteasa modificada y el evento de escisión se puede monitorear mediante SDS-PAGE seguido de tinción con Azul Brillante de Coomassie para proteína y análisis de productos de escisión usando densitometría. La actividad de la proteína diana también se evalúa, tal como, por ejemplo, en un ensayo de hemólisis, usando métodos descritos en la presente o que son bien conocidos en la técnica, para verificar que su función ha sido destruida por el evento de escisión.

3. Especificidad

La constante de especificidad de escisión de sustrato diana, *por* ejemplo, proteína C3 de complemento o plasminógeno, por un polipéptido de u-PA modificado se puede determinar mediante el uso de densitometría en gel para evaluar cambios en la densitometría a lo largo del tiempo de un sustrato diana de longitud completa incubada en presencia de un polipéptido de u-PA. En modalidades específicas, se puede usar la comparación de las especificidades de un polipéptido de u-PA modificado para determinar si el polipéptido de u-PA modificado exhibe especificidad alterada, por ejemplo, aumentada para C3 en comparación con el polipéptido de u-PA tipo silvestre. La especificidad de un polipéptido de u-PA para un sustrato diana, *por* ejemplo, proteína C3 de complemento, se puede determinar a partir de la constante de especificidad de escisión de un sustrato diana en comparación con un sustrato no diana (*por* ejemplo, el sustrato tipo silvestre nativo de u-PA). Se puede hacer una relación de las constantes de especificidad de un polipéptido de u-PA modificado para el sustrato diana C3 versus un sustrato no diana, tal como plasminógeno, para determinar una relación de la eficiencia de escisión del polipéptido de u-PA modificado. Se puede usar la comparación de la relación de la eficiencia de escisión entre un polipéptido de u-PA modificado y un polipéptido de u-PA tipo silvestre para evaluar el cambio de veces en la especificidad para un sustrato diana. La especificidad puede ser al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 veces o más cuando se compara con la

especificidad de un polipéptido de u-PA tipo silvestre para un sustrato diana versus un sustrato no diana.

El análisis cinético de escisión de sustratos nativos de un polipéptido de u-PA se puede comparar con el análisis de escisión de sustratos diana deseados en proteína C3 de complemento para evaluar la especificidad del polipéptido de u-PA modificado para proteína C3 de complemento. Se pueden evaluar constantes de velocidad de segundo orden de inhibición (k*i*) para monitorear la eficiencia y reactividad de un polipéptido de u-PA modificado para proteína C3 de complemento. Para fines de la presente, los polipéptidos de u-PA modificados escinden C3 de modo que se inhibe la activación del complemento y, como se muestra en los Ejemplos, lo hacen con una actividad significativamente mayor, tal como al menos 5 veces más actividad, que el polipéptido de u-PA no modificado (o polipéptido de u-PA modificado con el reemplazo de C122S, que elimina una cisteína libre para reducir así la agregación). Por ejemplo, el polipéptido de u-PA modificado de SEQ ID NO:21 escinde C3 humano en el ensayo descrito en la presente con una EC_{50} de 19 nM, en comparación con 3380 nM para el dominio de proteasa tipo silvestre de SEQ ID NO:5.

4. Modelos de Enfermedad

Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente se pueden usar en cualquier modelo de enfermedad clínicamente relevante conocido por un experto en la técnica para determinar sus efectos en enfermedades o trastornos mediados por complemento. Los ensayos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, ensayos para trasplante, incluidos ensayos *in vitro* con células de islotes humanos (Tjernberg *et al.* (2008) *Transplantation* 85:1193-1199)y ensayos ex vivo con riñones de cerdo (Fiane *et al.* (1999) *Xenotransplantation* 6:52-65); bioincompatibilidad, incluida la inflamación in vitro inducida por superficies (Lappegard *et al*. (2008) *J Biomed Mater Res A* 87:129-135; Lappegard *et ál.* (2005) *Ann Thorac Surg* 79:917-923; Nilsson *et al.* (1998) *Blood* 92:1661-1667; Schmidt *et al.* (2003) *J Biomed Mater Res A* 66:491-499); inflamación, incluida la inflamación *in vitro* inducida por *E. coli* (Mollnes *et al.* (2002) *Blood* 100:1867-1877) e inflamación inducida por el complejo heparina / protamina en babuinos (Soulika *et al.* (2000) *Clin Immunol* 96:212-221); degeneración macular relacionada con la edad en conejos y monos y roedores (Chi *et al.* (2010) *Adv Exp Med Biol* 703:127-135; Pennesi *et al.* (2012) *Mol. Aspects Med.* 33(4):487-509; Fletcher *et al.* (2014) *Optm. Vis. Sci.* 91(8):878-886; Forest *et al*., (2015) *Disease Models and Mechanisms* 8:421-427); y función de injerto retardada en cerdos (Hanto *et al*., (2010) *Am J Transplant* 10(11):2421-2430) y perros (Petrinec *et al*., (1996) *Surgery* 61:1331-1337).

F. MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAN PARA POLIPÉPTIDOS DE U-PA MODIFICADOS DE LOS MISMOS

Los polipéptidos de un polipéptido de u-PA modificado establecido en la presente se pueden obtener por métodos bien conocidos en la técnica para purificación de proteínas y expresión de proteína recombinante. Los polipéptidos también se pueden sintetizar químicamente. La modificación o variante, que incluye formas truncadas, se puede modificar a partir de un polipéptido tipo silvestre usando métodos de ADN recombinante estándar. Por ejemplo, los polipéptidos de u-PA modificados se pueden modificar a partir de un polipéptido tipo silvestre, tal como mediante mutagénesis dirigida al sitio.

1. Aislamiento o preparación de ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos de u-PA

Los polipéptidos se pueden clonar o aislar usando cualquier método disponible conocido en la técnica para clonar y aislar moléculas de ácido nucleico. Estos métodos incluyen amplificación por PCR de ácidos nucleicos y cribado de bibliotecas, incluyendo cribado de hibridación de ácido nucleico, cribado basado en anticuerpos y cribado basado en actividad.

Por ejemplo, cuando los polipéptidos se producen por medios recombinantes, se puede usar cualquier método conocido por aquellos expertos en la técnica para la identificación de ácidos nucleicos que codifican para genes deseados. Se puede usar cualquier método disponible en la técnica para obtener un ADNc de longitud completa o parcial (*es* decir, que comprende la región de codificación completa) o clon de ADN genómico que codifica para un u-PA, tal como de una fuente de célula o tejido.

Se pueden usar métodos para amplificación de ácidos nucleicos para aislar moléculas de ácido nucleico que codifican para un polipéptido deseado, que incluye, por ejemplo, métodos de reacción en cadena de polimerasa (PCR). Ejemplos de los métodos incluyen el uso de un ciclador térmico Perkin-Elmer Cetus y polimerasa Taq (amplificador génico). Un material que contiene ácido nucleico se puede usar como un material inicial a partir del cual se puede aislar una molécula deseada de ácido nucleico que codifica para polipéptidos. Por ejemplo, las preparaciones de ADN y ARNm, extractos celulares, extractos de tejido, muestras de fluido (*por* ejemplo, sangre, suero, saliva) y muestras de sujetos sanos y/o enfermos se pueden usar en métodos de amplificación. La fuente puede ser de cualquier especie eucariota incluyendo, pero no limitado a, vertebrados, mamíferos, humanos, porcinos, bovinos, felinos, aviares, equinos, caninos y otras fuentes de primates. Las bibliotecas de ácido nucleico también se pueden usar como una fuente de material inicial. Los cebadores se pueden diseñar para amplificar un polipéptido deseado. Por ejemplo, los cebadores se pueden diseñar con base en secuencias expresadas a partir de las cuales se genera un polipéptido deseado. Los cebadores se pueden diseñar con base en la retrotraducción de una secuencia

de aminoácidos de polipéptido. Si se desea, se pueden usar cebadores degenerados para la amplificación. Los cebadores oligonucleótidos que se hibridan con secuencias en los extremos 3' y 5' de la secuencia deseada se pueden usar como cebadores para amplificar mediante secuencias de PCR a partir de una muestra de ácido nucleico. Los cebadores se pueden usar para amplificar todo el u-PA de longitud completa, o una secuencia truncada del mismo, tal como un ácido nucleico que codifica para cualquiera de los polipéptidos de u-PA solubles proporcionados en la presente. Las moléculas de ácido nucleico generadas por amplificación se pueden secuenciar y confirmar para codificar un polipéptido deseado.

Se pueden unir secuencias de nucleótidos adicionales a una molécula de ácido nucleico que codifica para polipéptidos, que incluye secuencias enlazadoras que contienen sitios de endonucleasa de restricción con el fin de clonar el gen sintético en un vector, por ejemplo, un vector de expresión de proteína o un vector diseñado para la amplificación de las secuencias de ADN codificantes de proteína central. Además, se pueden enlazar de manera operativa secuencias de nucleótidos adicionales que especifican elementos de ADN funcionales a una molécula de ácido nucleico que codifica para polipéptidos. Ejemplos de las secuencias incluyen, pero no se limitan a, secuencias promotoras diseñadas para facilitar la expresión de proteína intracelular y secuencias de secreción, por ejemplo, secuencias señal heterólogas, diseñadas para facilitar la secreción de proteína. Estas secuencias se conocen por aquellos expertos en la técnica. Las secuencias de residuos de nucleótidos adicionales tal como secuencias de bases que especifican regiones de unión a proteínas también se pueden enlazar a moléculas de ácido nucleico que codifican para enzimas. Estas regiones incluyen, pero no se limitan a, secuencias de residuos que facilitan o codifican para proteínas que facilitan la absorción de una enzima en células diana específicas o alteran de otro modo la farmacocinética de un producto de un gen sintético.

Se pueden agregar etiquetas y/u otras porciones, por ejemplo, para ayudar en la detección o purificación de afinidad del polipéptido. Por ejemplo, secuencias de residuos de nucleótidos adicionales tal como secuencias de bases que especifican una etiqueta de epítopo u otro marcador detectable también se pueden enlazar a moléculas de ácido nucleico que codifican para enzimas. Ejemplos de estas secuencias incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican para una etiqueta SUMO o etiqueta His o etiqueta Flag.

Los ácidos nucleicos identificados y aislados después se pueden insertar en un vector de clonación adecuado. Se puede usar un gran número de sistemas hospedadores de vectores conocidos en la técnica. Los vectores posibles incluyen, pero no se limitan a, plásmidos o virus modificados, pero el sistema vectorial debe ser compatible con la célula hospedadora utilizada. Estos vectores incluyen, pero no se limitan a, bacteriófagos tal como

derivados lambda o plásmidos tal como derivados plásmidos pCMV4, pBR322 o pUC o el vector Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). La inserción en un vector de clonación, por ejemplo, se puede lograr ligando el fragmento de ADN en un vector de clonación que tiene extremos cohesivos complementarios. La inserción se puede realizar usando vectores de clonación TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Si los sitios de restricción complementarios utilizados para fragmentar el ADN no están presentes en el vector de clonación, los extremos de las moléculas de ADN se pueden modificar enzimáticamente. De manera alternativa, cualquier sitio deseado se puede producir al ligar secuencias de nucleótidos (ligadores) en los extremos de ADN; estos ligadores ligados pueden contener oligonucleótidos específicos sintetizados químicamente que codifican para secuencias de reconocimiento de endonucleasa de restricción. En un método alternativo, el gen de proteína y vector escindido se puede modificar mediante cola homopolimérica.

Las moléculas recombinantes se pueden introducir en células hospedadoras mediante, por ejemplo, transformación, transfección, infección, electroporación y sonoporación, de modo que se generen muchas copias de la secuencia génica. En modalidades específicas, la transformación de células hospedadoras con moléculas de ADN recombinante que incorporan el gen de proteína aislado, ADNc o secuencia de ADN sintetizado permite la generación de múltiples copias del gen. Por lo tanto, el gen se puede obtener en grandes cantidades al cultivar transformadores, aislar las moléculas de ADN recombinante de los transformadores y, cuando es necesario, recuperar el gen insertado del ADN recombinante aislado.

Además de la producción recombinante, los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente se pueden producir por síntesis de péptidos directa usando técnicas de fase sólida (*ver*, por ejemplo, Stewart *et al.* (1969) Solid-Phase Peptide Synthesis, WH Freeman Co., San Francisco; Merrifield J (1963) *J Am Chem Soc*., 85:2149-2154). La síntesis de proteínas in vitro se puede realizar usando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada se puede lograr, por ejemplo, usando Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer, Foster City CA) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Varios fragmentos de un polipéptido se pueden sintetizar químicamente por separado y combinarse usando métodos químicos.

También se proporcionan en la presente métodos de expresión de formas activas o activadas o activables de los polipéptidos de u-PA modificados, tal como formas activadas de dos cadenas y dímeros. Tal como se analizó y describió en la presente, y se ejemplifica en los Ejemplos 14-16, se puede preparar el ácido nucleico que codifica para proteínas de fusión de polipéptido de u-PA modificadas. Los ácidos nucleicos codifican los dominios de proteasa

de u-PA modificada, enlazados a ácido nucleico que codifica para otras secuencias, que incluyen, pero no se limitan a, señales de secreción, tal como, por ejemplo, la secuencia de señal de u-PA, una secuencia de señal de cadena kapp de IgG, y una secuencia de señal de IL-2, la porción de extremo N-terminal de u-PA (para producir u-PA de longitud completa), secuencias de activación, tal como, por ejemplo, la secuencia de activación de u-PA o una secuencia de furina, y compañeros de fusión, tal como una albúmina, para alterar una propiedad del u-PA, tal como semivida del suero, y/o una secuencia, tal como una etiqueta His y/o SUMO para aumentar la expresión y/o facilitar el aislamiento. Estas moléculas de ácido nucleico se pueden expresar en células hospedadoras adecuadas, conocidas por aquellos expertos en la técnica, para la producción de la proteína de fusión y/o u-PA modificado. En general, los ácidos nucleicos codifican para una secuencia señal u otra secuencia de tráfico para secreción o tráfico a un locus para purificación. Se puede usar incluir ácido nucleico que codifica para una secuencia de activación para producir una forma activada del polipéptido de u-PA modificado.

2. Generación de ácido nucleico mutante o modificado y polipéptidos codificantes

Las modificaciones proporcionadas en la presente se pueden realizar mediante técnicas de ADN recombinante estándar tal como son rutinarias para un experto en la técnica. Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para efectuar la mutación de uno o más aminoácidos en una proteína diana. Los métodos incluyen mutagénesis dirigida al sitio estándar (usando, *por* ejemplo, un kit, tal como QuikChange disponible a partir de Stratagene) de moléculas de ácido nucleico codificantes, o mediante métodos de síntesis de polipéptidos de fase sólida.

3. Vectores y células

Para la expresión recombinante de una o más de las proteínas deseadas, tal como cualquier polipéptido de u-PA modificado descrito en la presente, el ácido nucleico que contiene toda o una porción de la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína se puede insertar en un vector de expresión adecuado, *es* decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante de proteína insertada. Las señales transcripcionales y traduccionales necesarias también se pueden suministrar por el promotor nativo para genes enzimáticos y/o sus regiones flanqueantes.

También se proporcionan vectores que contienen un ácido nucleico que codifica para la enzima. También se proporcionan células que contienen los vectores. Las células incluyen células eucariotas y procariotas, y los vectores son cualquier adecuados para su uso

en las mismas. En general, la célula es una célula que es capaz de efectuar la glicosilación de la proteína codificada.

Se proporcionan células procariotas y eucariotas que contienen los vectores. Estas células incluyen células bacterianas, células de levadura, células fúngicas, Archea, células vegetales, células de insectos y células animales. Las células se utilizan para producir una proteína de las mismas al cultivar las células descritas anteriormente en condiciones por las cuales la proteína codificada se expresa por la célula y recuperar la proteína expresada. Para propósitos en la presente, por ejemplo, la enzima se puede secretar en el medio.

Se puede elegir una cepa de célula hospedadora por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína expresada de la manera deseada. Las modificaciones del polipéptido incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento postraduccional puede afectar el plegado y/o función del polipéptido. Diferentes células hospedadoras, tal como, pero no limitado a, CHO (DG44, DXB11, CHO-K1), HeLa, MCDK, 293 y WI38 tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para las actividades postraduccionales y se pueden elegir para garantizar la modificación y procesamiento correcto de la proteína introducida. En general, la elección de célula es una que es capaz de introducir glicosilación enlazada a N en el polipéptido expresado. Por lo tanto, se proporcionan células eucariotas que contienen los vectores. Células eucariotas de ejemplo son células mamíferas de ovario de hámster chino (CHO). Por ejemplo, las células CHO deficientes en dihidrofolato reductasa (*por* ejemplo, células DG44) se utilizan para producir polipéptidos proporcionados en la presente.

Se proporcionan vectores que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido de u-PA modificado, acoplado a la secuencia de señal nativa o heteróloga, así como múltiples copias de los mismos. Los vectores se pueden seleccionar para la expresión de la proteína enzimática en la célula o de modo que la proteína enzimática se exprese como una proteína secretada.

En una modalidad, se proporcionan vectores que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que tiene actividad de proteasa y contiene toda o una porción del dominio de proteasa, o múltiples copias del mismo. También se proporcionan vectores que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica para el dominio de proteasa y porciones adicionales de una proteína de proteasa hasta e incluyendo una proteína de proteasa de longitud completa, así como múltiples copias de los mismos. Los vectores se pueden seleccionar para la expresión de la proteína de proteasa modificada o andamiaje o dominio de proteasa de la mismas en la célula o de modo que la proteína proteasa

se exprese como una proteína secretada. Cuando se expresa el dominio de proteasa, el ácido nucleico se une al ácido nucleico que codifica para una señal de secreción, tal como la secuencia de señal del factor α-mating *Saccharomyces cerevisiae* o una porción de la misma, o la secuencia de señal nativa.

Se puede usar una variedad de sistemas de vector hospedador para expresar la secuencia de codificación de proteína. Estos incluyen, pero no se limitan a, sistemas celulares de mamíferos infectados con virus (*por* ejemplo, virus de vaccinia, adenovirus y otros virus); sistemas celulares de insectos infectados con virus (*por* ejemplo, baculovirus); microorganismos tal como vectores de levadura que contienen levadura; o bacterias transformadas con bacteriófago, ADN, ADN plásmido o ADN cósmido. Los elementos de expresión de los vectores varían en sus fortalezas y especificidades. Dependiendo del sistema del vector hospedador utilizado, se puede usar cualquiera de un número de elementos de traducción y transcripción adecuados.

Se pueden usar cualquier método conocido por aquellos expertos en la técnica para la inserción de fragmentos de ADN en un vector para construir vectores de expresión que contienen un gen quimérico que contiene señales de control transcripcional/traduccional adecuadas y secuencias codificantes de proteínas. Estos métodos pueden incluir ADN recombinante *in vitro* y técnicas sintéticas y recombinantes *in vivo* (recombinación genética). La expresión de secuencias de ácido nucleico que codifican para proteínas, o dominios, derivados, fragmentos u homólogos de los mismos, se puede regular mediante una segunda secuencia de ácido nucleico de modo que los genes o fragmentos de los mismos se expresen en un hospedador transformado con las moléculas de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión de las proteínas se puede controlar por cualquier promotor/potenciador conocido en la técnica. En una modalidad específica, el promotor no es nativo de los genes para una proteína deseada. Los promotores que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, el promotor temprano SV40 (Bernoist y Chambon, *Nature 290*:304-310 (1981)), el promotor contenido en la repetición terminal de 3’ de largo del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto *et al*. *Cell 22*:787-797 (1980)), el promotor de la timidina cinasa del herpes (Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* EUA *78*:1441-1445 (1981)), las secuencias reguladoras del gen metalotioneína (Brinster *et al.*, *Nature 296*:39-42 (1982)); vectores de expresión procariotas tal como el promotor de β-lactamasa (Jay *et al*., (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci.* EUA *78*:5543) o el promotor *tac* (DeBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 80*:21-25 (1983); ver también “Useful Proteins from Recombinant Bacteria”: in *Scientific American* 242:79-94 (1980)); vectores de expresión de plantas que contienen el promotor de nopalina sintetasa (Herrara-Estrella *et al*., *Nature 303*:209-213 (1984)) o el promotor del ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor

(Garder *et al.*, *Nucleic Acids Res*. *9*:2871 (1981)), y el promotor de la enzima fotosintética ribulosa bisfosfato carboxilasa (Herrera-Estrella *et ál.*, *Nature 310*:115-120 (1984)); elementos promotores de levadura y otros hongos tal como el promotor Gal4, el promotor de alcohol deshidrogenasa, el promotor de fosfoglicerol cinasa, el promotor de fosfatasa alcalina y las siguientes regiones de control transcripcional animal que exhiben especificidad de tejido y se han utilizado en animales transgénicos: región de control génico de elastasa I que es activa en células acinares pancreáticas (Swift *et ál*., *Cell 38*:639-646 (1984); Ornitz *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50*:399-409 (1986); MacDonald, *Hepatology 7*:425-515 (1987)); región de control génico de insulina que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan *et al*., *Nature 315*:115-122 (1985)), región de control génico de inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl *et al.*, *Cell 38*:647-658 (1984); Adams *et ál.*, *Nature 318*:533-538 (1985); Alexander *et al.*, *Mol. Cell Biol. 7*:1436-1444 (1987)), región de control del virus tumoral mamario de ratón que es activa en células testiculares, mamarias, linfoides y mastocitos (Leder *et al.*, *Cell 45*:485-495 (1986)), región de control génico de albúmina que es activa en el hígado (Pinckert *et al.*, *Genes y Devel. 1*:268-276 (1987)), región de control génico de alfa-fetoproteína que es activa en el hígado (Krumlauf *et al*., *Mol. Cell. Biol. 5*:1639-1648 (1985); Hammer *et al.*, *Science 235*:53-58 (1987)), región de control génico de antitripsina alfa-1 que es activa en el hígado (Kelsey *et al.*, *Genes y Devel. 1*:161-171 (1987)), región de control génico de betaglobina que es activa en células mieloides (Magram *et al.*, *Nature 315*:338-340 (1985); Kollias *et al.*, *Cell 46*:89-94 (1986)), región de control génico de proteína básica de mielina que es activa en células oligodendrocíticas del cerebro (Readhead *et al.*, *Cell 48*:703-712 (1987)), región de control génico de cadena ligera-2 de miosina que es activa en el músculo esquelético (Shani, *Nature 314*:283-286 (1985)) y región de control génico de hormona liberadora gonadotrófica que es activa en gonadotrofos del hipotálamo (Mason *et al*., *Science 234*:1372-1378 (1986)).

En una modalidad específica, se utiliza un vector que contiene un promotor enlazado operativamente a ácidos nucleicos que codifican para una proteína deseada, o un dominio, fragmento, derivado u homólogo del mismo, uno o más orígenes de replicación y, opcionalmente, uno o más marcadores seleccionables (*por* ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos). Dependiendo del sistema de expresión, también se requieren señales de iniciación específicas para la traducción eficiente de una secuencia de u-PA. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. En los casos en que el codón de iniciación y las secuencias anteriores de u-PA o fragmentos catalíticamente activos del mismo se insertan en el vector de expresión adecuado, no se necesitan señales de control de traducción adicionales. En los casos en que solo se inserte una secuencia codificante, o una

porción de la misma, se deberán proporcionar señales de control transcripcional exógenas, incluido el codón de iniciación ATG. Además, el codón de iniciación debe estar en el marco de lectura correcto para garantizar la transcripción de todo el inserto. Los elementos transcripcionales exógenos y los codones de iniciación pueden ser de diversos orígenes, naturales y sintéticos. La eficiencia de expresión se puede mejorar mediante la inclusión de potenciadores apropiados para el sistema celular en uso (Scharf *et al.* (1994) *Results Probl Cell Differ* 20:125-62; Bittner *et al.* (1987) *Methods in Enzymol*, 153:516-544).

Los vectores plásmidos de ejemplo para la transformación de células *de E. coli* incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión de pQE (disponibles en Qiagen®, Valencia, CA; ver también literatura publicada por Qiagen® que describe el sistema). los vectores de pQE tienen un promotor de fago T5 (reconocido por la polimerasa de ARN de *E. coli*) y un módulo de represión de operador de doble lac para proporcionar una expresión de alto nivel estrechamente regulada de proteínas recombinantes en *E. coli,* un sitio de unión ribosomal sintético (RBS II) para una traducción eficiente, una secuencia codificante de etiqueta 6XHis, terminadores transcripcionales t_0 y T1, origen de replicación de ColE1 y un gen de beta-lactamasa para conferir resistencia a ampicilina. Los vectores pQE permiten la colocación de una etiqueta 6xHis en el extremo N-terminal o C-terminal de la proteína recombinante. Los plásmidos incluyen pQE 32, pQE 30 y pQE 31 que proporcionan múltiples sitios de clonación para los tres marcos de lectura y proporcionan la expresión de proteínas etiquetadas con 6xHis en el extremo N-terminal. Otros vectores plásmidos de ejemplo para la transformación de células de *E. coli* incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión de pET (ver, patente de Estados Unidos 4,952,496; disponible en Novagen®, Madison, WI; ver, también literatura publicada por Novagen® que describe el sistema). Estos plásmidos incluyen pET 11a, que contiene el promotor T7lac, el terminador T7, el operador inducible *de E. coli* lac y el gen represor de lac; pET 12a-c, que contiene el promotor T7, el terminador T7 y la señal de secreción de *E. coli* ompT; y pET 15b y pET19b (Novagen®, Madison, WI), que contienen una secuencia líder de His-Tag™ para su uso en purificación con una columna His y un sitio de escisión de trombina que permite la escisión después de la purificación sobre la columna, la región promotora T7-lac y el terminador T7.

Habitualmente, los vectores pueden ser plásmido, viral u otros conocidos en la técnica, utilizados para la expresión del polipéptido de u-PA modificado *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, el polipéptido de u-PA modificado se expresa en células mamíferas, que incluyen, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO).

Se pueden emplear vectores virales, tal como vectores de adenovirus, retrovirus o virus vaccinia. En algunos ejemplos, el vector es un vector retroviral u otro vector viral

defectuoso o atenuado (ver la patente de Estados Unidos No. 4,980,286). Por ejemplo, se puede usar un vector retroviral (ver Miller *et al*., *Meth. Enzymol.* 217: 581-599 (1993)). Estos vectores retrovirales se han modificado para eliminar secuencias retrovirales que no son necesarias para el empaquetado del genoma viral y la integración en el ADN de la célula hospedadora. En algunos ejemplos, los virus armados con un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de u-PA modificado pueden facilitar su replicación y propagación dentro de un tejido diana. El virus también puede ser un virus lítico o un virus no lítico donde el virus se replica selectivamente bajo un promotor específico de tejido. A medida que los virus se replican, la coexpresión del polipéptido de u-PA con genes virales facilitará la propagación del virus *in vivo*.

4. Expresión

Los polipéptidos de u-PA modificados se pueden producir por cualquier método conocido por aquellos expertos en la técnica que incluye métodos *in vivo* e *in vitro*. Las proteínas deseadas se pueden expresar en cualquier organismo adecuado para producir las cantidades y formas requeridas de las proteínas, tal como, por ejemplo, necesarias para administración y tratamiento. Los hospedadores de expresión incluyen organismos procariotas y eucariotas tal como *E.coli*, levadura, plantas, células de insecto, células de mamífero, incluyendo líneas celulares humanas y animales transgénicos. Los hospedadores de expresión pueden diferir en sus niveles de producción de proteínas, así como en los tipos de modificaciones postraduccionales que están presentes en las proteínas expresadas. La elección del hospedador de expresión se puede realizar con base en estos y otros factores, tal como consideraciones reguladoras y de seguridad, costos de producción y la necesidad y métodos de purificación.

Muchos vectores de expresión están disponibles y se conocen por aquellos expertos en la técnica y se pueden usar para la expresión de proteínas. La elección del vector de expresión estará influenciada por la elección del sistema de expresión hospedador. En general, los vectores de expresión pueden incluir promotores transcripcionales y opcionalmente potenciadores, señales traduccionales y señales de terminación transcripcional y traduccional. Los vectores de expresión que se utilizan para la transformación estable habitualmente tienen un marcador seleccionable que permite la selección y el mantenimiento de las células transformadas. En algunos casos, se puede usar un origen de replicación para amplificar el número de copia del vector.

Los polipéptidos de u-PA modificados también se pueden utilizar o expresar como fusiones de proteínas. Por ejemplo, se puede generar una fusión enzimática para agregar funcionalidad adicional a una enzima. Ejemplos de proteínas de fusión enzimática incluyen,

pero no se limitan a, fusiones de una secuencia señal, una etiqueta tal como para localización, *por* ejemplo, una etiqueta His_6 o una etiqueta myc, o una etiqueta para purificación, por ejemplo, una fusión GST y una secuencia para dirigir la secreción de proteína y/o asociación de membrana.

Por ejemplo, un polipéptido de u-PA modificado descrito en la presente es uno que se genera por expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica para el dominio de proteasa expuesto en cualquiera de SEQ ID Núms: 1-6, 8-44 y 52-75 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 65%, 70%, 75%, 80%, 84%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia a una secuencia expuesta cualquiera de SEQ ID Núms: 1-6, 8-44 y 52-75.

Para la producción a largo plazo y de alto rendimiento de proteínas recombinantes, se desea una expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable un polipéptido de u-PA modificado se pueden transformar usando vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable. Después de la introducción del vector, se puede permitir que las células crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de que se cambien a un medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento y la recuperación de células que expresan con éxito las secuencias introducidas. Las células resistentes de células transformadas de manera estable se pueden proliferar utilizando técnicas de cultivo de tejido apropiadas para los tipos de células.

Se puede usar cualquier número de sistemas de selección para recuperar líneas celulares transformadas. Estos incluyen, pero no se limitan a, la timidina cinasa del virus del herpes simple (Wigler *et al*., (1977) *Cell* 11:223-232) y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy I *et al*. (1980) *Cell*, 22:817-23) genes, que se pueden emplear en células TK- o APRT, respectivamente. Además, se puede usar resistencia a antimetabolitos, antibióticos o herbicidas como la base para la selección. Por ejemplo, DHFR, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler M *et al.* (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci*, 77:3567-70); npt, que confiere resistencia a los aminoglucósidos neomicina y G-418 (Colbere-Garapin F *et al*. (1981) *J. Mol. Biol*., 150:1-14); y se pueden usar als o pat, que confieren resistencia a clorsulfurón y fosfinotricina acetiltransferasa, respectivamente. Se han descrito genes seleccionables adicionales, por ejemplo, trpB, que permite a las células utilizar indol en lugar de triptófano, o hisD, que permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina (Hartman SC y RC Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci*, 85:8047-8051). Los marcadores visibles, tal como pero no limitado a, antocianinas, betaglucuronidasa y su sustrato, GUS, y luciferasa y su sustrato

luciferina, también se pueden usar para identificar transformadores y también para cuantificar la cantidad de expresión de proteína transitoria o estable atribuible a un sistema vectorial particular (Rhodes CA *et al*. (1995) *Methods Mol. Biol.* 55:121-131).

La presencia y expresión de polipéptidos de u-PA se pueden monitorear. Por ejemplo, la detección de un polipéptido funcional se puede determinar al analizar el medio acondicionado para determinar la actividad de la enzima hialuronidasa en condiciones adecuadas. En la presente se proporcionan ensayos de ejemplo para evaluar la solubilidad y actividad de proteínas expresadas.

a. Células procariotas

Los procariotas, especialmente *E. coli*, proporcionan un sistema para producir grandes cantidades de proteínas. La transformación de *E. coli* es una técnica simple y rápida conocida por aquellos expertos en la técnica. Los vectores de expresión para *E.coli* pueden contener promotores inducibles; los promotores son útiles para inducir altos niveles de expresión de proteínas y para expresar proteínas que exhiben cierta toxicidad para las células hospedadoras. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen el promotor de lac, el promotor de trp, el promotor de tac híbrido, los promotores de ARN T7 y SP6 y el promotor de λPL regulado por temperatura.

Las proteínas, tal como cualquiera proporcionado en la presente, se pueden expresar en el entorno citoplasmático de *E. coli*. El citoplasma es un entorno reductor y para algunas moléculas, esto puede dar como resultado la formación de cuerpos de inclusión insolubles. Los agentes reductores tal como ditioterotol y β-mercaptoetanol y desnaturalizantes, tal como guanidina-HCl y urea se pueden usar para volver a disolver las proteínas. Un enfoque alternativo es la expresión de proteínas en el espacio periplásmico de bacterias que proporciona un entorno oxidante e isomerasas tipo chaperonina y disulfuro y puede conducir a la producción de proteína soluble. Habitualmente, una secuencia líder se fusiona a la proteína a expresar que dirige la proteína al periplasma. Después, el líder se retira mediante peptidasas de señal dentro del periplasma. Los ejemplos de secuencias líderes dirigidas a periplásmicos incluyen el líder de pelB del gen de lisina pectatal y el líder derivado del gen de fosfatasa alcalina. En algunos casos, la expresión periplásmica permite la fuga de la proteína expresada en el medio de cultivo. La secreción de proteínas permite una purificación rápida y sencilla del sobrenadante de cultivo. Las proteínas que no se secretan se pueden obtener del periplasma mediante lisis osmótica. De manera similar a la expresión citoplásmica, en algunos casos las proteínas pueden volverse insolubles y se pueden usar desnaturalizantes y agentes reductores para facilitar la solubilización y replegamiento. La temperatura de inducción y crecimiento también puede influir en los niveles de expresión y

solubilidad, habitualmente se utilizan temperaturas entre 25 °C y 37 °C. Habitualmente, las bacterias producen proteínas aglicosiladas. Por lo tanto, si las proteínas requieren glicosilación para la función, la glicosilación se puede agregar *in vitro* después de la purificación de células hospedadoras.

b. Células de Levadura

Las levaduras tal como *Saccharomyces cerevisae, Schizosaccharomyces pombe, Yarrowia lipolytica, Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris* son hospedadores de expresión de levadura bien conocidos que se pueden utilizar para la producción de proteínas, tal como cualquiera descrito en la presente. La levadura se puede transformar con vectores de replicación episómica o mediante integración cromosómica estable mediante recombinación homóloga. Habitualmente, los promotores inducibles se usan para regular la expresión génica. Ejemplos de los promotores incluyen promotores de GAL1, GAL7 y GAL5 y metalotioneína, tal como CUP1, AOX1 u otro promotor de *Pichia* u otro promotor de levadura. Los vectores de expresión a menudo incluyen un marcador seleccionable tal como LEU2, TRP1, HIS3 y URA3 para la selección y el mantenimiento del ADN transformado. Las proteínas expresadas en levadura son a menudo solubles. La coexpresión con chaperoninas tal como Bip y disulfuro de proteína isomerasa puede mejorar los niveles de expresión y solubilidad. Además, las proteínas expresadas en levadura se pueden dirigir para secreción usando fusiones de péptidos de señal de secreción tal como la señal de secreción de factor alfa de apareamiento de levadura de *Saccharomyces cerevisae* y fusiones con proteínas de superficie celular de levadura tal como el receptor de adhesión de apareamiento Aga2p o la glucoamilasa de *Arxula adeninivoran*. Un sitio de escisión de proteasa tal como para la proteasa Kex-2, se puede modificar para retirar las secuencias fusionadas de los polipéptidos expresados a medida que salen de la vía de secreción. La levadura también es capaz de glicosilación en motivos Asn-X-Ser/Thr.

c. Insectos y células de insectos

Las células de insecto, particularmente usando expresión de baculovirus, son útiles para expresar polipéptidos tal como polipéptidos de u-PA. Las células de insectos expresan altos niveles de proteína y son capaces de la mayoría de las modificaciones postraduccionales utilizadas por eucariotas superiores. Los baculovirus tienen un intervalo de hospedadores restrictivo que mejora la seguridad y reduce las preocupaciones regulatorias de la expresión eucariota. Los vectores de expresión habituales utilizan un promotor para la expresión de alto nivel tal como el promotor de poliedrina de baculovirus. Los sistemas de baculovirus comúnmente utilizados incluyen los baculovirus tal como virus de poliedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) y virus de poliedrosis nuclear *Bombyx mori* (BmNPV) y una

línea celular de insectos tal como Sf9 derivada de *Spodoptera frugiperda*, *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1). Para una expresión de alto nivel, la secuencia de nucleótidos de la molécula que se desea expresar se fusiona inmediatamente posterior al codón de inicio de poliedrina del virus. Las señales de secreción de mamífero se procesan con precisión en células de insecto y se pueden utilizar para secretar la proteína expresada en el medio de cultivo. Las líneas celulares *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1) producen proteínas con patrones de glicosilación similares a los sistemas celulares de mamíferos. Células de insecto de ejemplo son aquellas que se han alterado para reducir la inmunogenicidad, incluidas aquellas con vectores de expresión de baculovirus “mamíferos” y aquellas que carecen de la enzima FT3.

Un sistema de expresión alternativo en células de insecto es el uso de células transformadas de manera estable. Las líneas celulares tal como las células Schnieder 2 (S2) y Kc (*Drosophila melanogaster*) y células C7 (*Aedes albopictus*) se pueden usar para expresión. El promotor de metalotioneína *Drosophila* se puede usar para inducir altos niveles de expresión en presencia de inducción de metales pesados con cadmio o cobre. Los vectores de expresión se mantienen habitualmente mediante el uso de marcadores seleccionables tal como neomicina e higromicina.

d. Expresión mamífera

Se pueden usar sistemas de expresión de mamífero para expresar proteínas que incluyen polipéptidos de U-PA. Las construcciones de expresión se pueden transferir a células de mamífero mediante infección viral tal como adenovirus o mediante transferencia directa de ADN tal como liposomas, fosfato de calcio, DEAE-dextrano y por medios físicos tal como electroporación y microinyección. Los vectores de expresión para células de mamífero habitualmente incluyen un sitio de casquete de ARNm, una caja TATA, una secuencia de iniciación traduccional (secuencia de consenso Kozak) y elementos de poliadenilación. Los elementos IRES también se pueden agregar para permitir la expresión bicistrónica con otro gen, tal como un marcador seleccionable. Estos vectores a menudo incluyen potenciadores promotores transcripcionales para expresión de alto nivel, por ejemplo, el potenciador promotor SV40, el promotor de citomegalovirus humano (CMV) y la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous (RSV). Estos potenciadores de promotores son activos en muchos tipos de células. Los promotores de tipo celular y de tejido y regiones potenciadoras también se pueden usar para expresión. Las regiones promotoras/potenciadoras de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, aquellos de genes tal como elastasa I, insulina, inmunoglobulina, virus tumoral mamario de ratón, albúmina, fetoproteína alfa, alfa 1 antitripsina, beta globina, proteína básica de mielina, cadena ligera de miosina 2 y control

génico de hormona liberadora gonadotrópica. Se pueden usar marcadores seleccionables para seleccionar y mantener células con la construcción de expresión. Ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen, pero no se limitan a, higromicina B fosfotransferasa, adenosina desaminasa, xantina-guanina fosforribosil transferasa, aminoglucósido fosfotransferasa, dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidina cinasa. Por ejemplo, la expresión se puede realizar en la presencia de metotrexato para seleccionar solo aquellas células que expresan el gen DHFR. La fusión con moléculas de señalización de superficie celular tal como TCR-ζ y $Fc_{\varepsilon}RI$-γ puede dirigir la expresión de las proteínas en un estado activo en la superficie celular.

Muchas líneas celulares están disponibles para la expresión de mamíferos, incluyendo células de ratón, humana de rata, mono, pollo y hámster. Ejemplos de líneas celulares incluyen, pero no se limitan a, líneas celulares de CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, NS0 de ratón (no secretante) y otras líneas celulares de mieloma, líneas celulares de hibridoma y heterohibridoma, linfocitos, fibroblastos, Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 2B8 y células HKB. Las líneas celulares también están disponibles adaptadas a medios libres de suero que facilitan la purificación de proteínas secretadas del medio de cultivo celular. Los ejemplos incluyen células CHO-S (Invitrogen®, Carlsbad, CA, cat # 11619-012) y la línea celular EBNA-1 libre de suero (Pham *et al*., (2003) *Biotechnol. Bioeng. 84*:332-42.). Las líneas celulares también están disponibles que están adaptadas para crecer en medios especiales optimizados para la máxima expresión. Por ejemplo, las células CHO DG44 se adaptan para crecer en cultivo en suspensión en un medio definido químicamente, libre de productos animales.

e. Plantas

Se pueden usar células y plantas vegetales transgénicas para expresar proteínas tal como cualquiera descrito en la presente. Las construcciones de expresión se transfieren habitualmente a plantas usando transferencia directa de ADN tal como bombardeo de microproyectil y transferencia mediada por PEG en protoplastos y con transformación mediada por agrobacterias. Los vectores de expresión pueden incluir secuencias promotoras y potenciadoras, elementos de terminación transcripcional y elementos de control traduccional. Los vectores de expresión y las técnicas de transformación en general se dividen entre hospedadores dicot, tal como *Arabidopsis* y tabaco, y hospedadores monocot, tal como maíz y arroz. Los ejemplos de promotores de plantas utilizados para la expresión incluyen el promotor del virus del mosaico de coliflor, el promotor de nopalina sintetasa, el promotor de ribosa bisfosfato carboxilasa y los promotores de ubiquitina y UBQ3. Los marcadores seleccionables tal como higromicina, fosfomanosa isomerasa y neomicina fosfotransferasa a

menudo se utilizan para facilitar la selección y el mantenimiento de células transformadas. Las células vegetales transformadas se pueden mantener en cultivo como células, agregados (tejido calloso) o regenerarse en plantas enteras. Las células vegetales transgénicas también pueden incluir algas modificadas para producir polipéptidos de hialuronidasa. Debido a que las plantas tienen patrones de glicosilación diferentes a las células de mamífero, esto puede influir en la elección de proteína producida en estos hospedadores.

5. Purificación

Las células hospedadoras transformadas con una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido de u-PA modificado se pueden cultivar en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína codificada del cultivo celular. La proteína producida por una célula recombinante en general se secreta, pero se puede contener intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o el vector utilizado. Como lo entienden aquellos expertos en la técnica, los vectores de expresión que contienen ácido nucleico que codifica para u-PA se pueden diseñar con secuencias de señal que facilitan la secreción directa de u-PA a través de membrana celular procariota o eucariota.

Por lo tanto, los métodos para la purificación de polipéptidos de células hospedadoras dependen de las células hospedadoras y sistemas de expresión elegidos. Para moléculas secretadas, las proteínas en general se purifican del medio de cultivo después de retirar las células. Para la expresión intracelular, las células se pueden lisar y las proteínas se pueden purificar del extracto. Cuando se utilizan organismos transgénicos tal como plantas y animales transgénicos para la expresión, se pueden usar tejidos u órganos como material inicial para elaborar un extracto celular lisado. Además, la producción animal transgénica puede incluir la producción de polipéptidos en leche o huevos, que se pueden recolectar, y si es necesario, las proteínas se pueden extraer y purificar adicionalmente usando métodos estándar en la técnica.

Las proteínas, tal como polipéptidos de u-PA modificados, se pueden purificar usando técnicas de purificación de proteínas estándar conocidas en la técnica que incluyen pero no se limitan a, SDS-PAGE, fraccionamiento de tamaño y cromatografía de exclusión de tamaño, precipitación de sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico, tal como intercambio aniónico. Las técnicas de purificación de afinidad también se pueden utilizar para mejorar la eficiencia y pureza de las preparaciones. Por ejemplo, anticuerpos, receptores y otras moléculas que se unen a proteínas de u-PA se pueden usar en purificación por afinidad.

Las construcciones de expresión también se pueden modificar para agregar una etiqueta de afinidad a una proteína tal como una etiqueta de modificador tipo ubiquitina pequeña (SUMO), epítopo myc, fusión GST o His_6 y afinidad purificada con SUMO o

anticuerpo myc, resina de glutatión y Ni-resina, respectivamente. Estas etiquetas se pueden unir a la secuencia de nucleótidos que codifica para un u-PA como se describe en otra parte en la presente, lo que puede facilitar la purificación de proteínas solubles. Por ejemplo, un polipéptido de u-PA modificado se puede expresar como una proteína recombinante con uno o más dominios de polipéptido adicionales agregados para facilitar la purificación de proteínas. Estos dominios facilitadores de purificación incluyen, pero no se limitan a, péptidos quelantes metálicos tal como módulos histidina-triptófano que permiten la purificación en metales inmovilizados, dominios de proteína A que permiten la purificación en inmunoglobulina inmovilizada y el dominio utilizado en el sistema de purificación de afinidad/extensión FLAGS (Immunex Corp., Seattle Wash.). La inclusión de una secuencia enlazadora escindible tal como Factor XA o enterocinasa (Invitrogen®, San Diego, CA) entre el dominio de purificación y el polipéptido u-PA expresado es útil para facilitar la purificación. Uno de los vectores de expresión proporciona la expresión de una proteína de fusión que contiene un polipéptido de u-PA en un sitio de escisión de enterocinasa. La etiqueta de modificador tipo ubiquitina pequeña (SUMO) facilita la purificación en IMIAC (cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados), mientras que el sitio de escisión de enterocinasa proporciona un medio para purificar el polipéptido de la proteína de fusión.

La pureza se puede evaluar por cualquier método conocido en la técnica que incluye electroforesis en gel, métodos de HPLC ortogonal, tinción y técnicas espectrofotométricas. La proteína expresada y purificada se puede analizar usando cualquier ensayo o método conocido por un experto en la técnica, por ejemplo, cualquiera descrito en la Sección 3. Estos incluyen ensayos basados en las propiedades físicas y/o funcionales de la proteína, incluyendo, pero no limitado a, análisis por electroforesis en gel, inmunoensayo y ensayos de actividad de u-PA.

6. Modificaciones Adicionales

Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente se pueden modificar para mejorar o alterar las propiedades farmacocinéticas y farmacológicas. En particular, los polipéptidos de u-PA modificados se pueden conjugar a un polímero, tal como una porción PEG o dextrano o sialiación para reducir la inmunogenicidad y/o aumentar la semivida en suero y otros fluidos corporales que incluyen humor vítreo.

a. PEGilación

El polietilenglicol (PEG) se utiliza en biomateriales, biotecnología y medicina principalmente porque el PEG es un polímero biocompatible, no tóxico, soluble en agua que es habitualmente no inmunogénico (Zhao y Harris, *ACS Symposium Series* 680: 458-72, 1997). En el área de administración de fármacos, los derivados de PEG se han utilizado

ampliamente en la unión covalente (es decir, "PEGilación") a proteínas para reducir la inmunogenicidad, proteólisis y depuración renal para aumentar la semivida en suero y mejorar la solubilidad (Zalipsky, *Adv*. *Drug Del. Rev.* 16:157-82, 1995). De manera similar, PEG se ha unido a fármacos relativamente hidrofóbicos de bajo peso molecular para mejorar la solubilidad, reducir la toxicidad y alterar la biodistribución. Habitualmente, los fármacos PEGilados se inyectan como soluciones.

Una aplicación relacionada es la síntesis de redes de PEG degradables reticuladas o formulaciones para su uso en la administración de fármacos, ya que gran parte de la misma química utilizada en el diseño de portadores de fármacos solubles degradables también se puede usar en el diseño de geles degradables (Sawhney *et al*., *Macromoléculas* 26: 581-87, 1993). También se sabe que los complejos intermacromoleculares se pueden formar al mezclar soluciones de dos polímeros complementarios. Estos complejos se estabilizan en general mediante interacciones electrostáticas (polianión-policatión) y/o enlaces de hidrógeno (poliácido polibase) entre los polímeros implicados, y/o mediante interacciones hidrofóbicas entre los polímeros en un entorno acuoso (Krupers *et al*., *Eur*. *Polym J.* 32:785-790, 1996). Por ejemplo, las soluciones de mezcla de ácido poliacrílico (PAAc) y óxido de polietileno (PEO) en las condiciones adecuadas dan como resultado la formación de complejos basados principalmente en la unión de hidrógeno. La disociación de estos complejos en condiciones fisiológicas se ha utilizado para la administración de fármacos libres (*es* decir, no pegilados). Se han formado complejos de polímeros complementarios a partir de homopolímeros y copolímeros.

Se conocen numerosos reactivos para PEGilación como son proteínas terapéuticas de porción PEG (PEGiladas). Los reactivos incluyen, pero no se limitan a, reacción del polipéptido con PEG activado por N-hidroxisuccinimidilo (NHS), succinimidilo mPEG, $mPEG_2$-N-hidroxisuccinimida, alfa-metilbutanoato de succinimidilo mPEG, propionato de succinimidilo mPEG, butanoato de succinimidilo mPEG, éster succinimidílico de ácido carboximetil 3-hidroxibutanoico mPEG, propionato de PEG-succinimidilo homobifuncional, PEG propionaldehído homobifuncional, PEG butiraldehído homobifuncional, PEG maleimida, hidrazida PEG, PEG de p-nitrofenil-carbonato, carbonato de mPEG-benzotriazol, PEG propionaldehído, butiraldehído mPEG, butiraldehído $mPEG_2$ ramificado, mPEG acetilo, piperidona mPEG, metilcetona mPEG, maleimida “sin enlace" mPEG, vinilsulfona mPEG, tiol mPEG, tioéster de ortopiridilo mPEG, disulfuro de ortopiridilo mPE, -Fmoc-PEG-NHS, Boc-PEG-NHS, vinilsulfona de PEG-NHS, acrilato de PEG-NHG, fluoresceína PEG-NHS, y biotina PEG-nhs (*por* ejemplo, ver Monfardini *et al.*, *Bioconjugate Chem*. 6:62-69, 1995; Veronese *et al.*, *J. Bioactive Compatible Polymers* 12:197-207, 1997; U.S. 5,672,662; U.S. 5,932,462; U.S.

6,495,659; U.S. 6,737,505; U.S. 4,002,531; U.S. 4,179,337; U.S. 5,122,614; U.S. 5,324, 844; U.S. 5,446,090; U.S. 5,612,460; U.S. 5,643,575; U.S. 5,766,581; U.S. 5,795, 569; U.S. 5,808,096; U.S. 5,900,461; U.S. 5,919,455; U.S. 5,985,263; U.S. 5,990, 237; U.S. 6,113,906; U.S. 6,214,966; U.S. 6,258,351; U.S. 6,340,742; U.S. 6,413,507; U.S. 6,420,339; U.S. 6,437,025; U.S. 6,448,369; U.S. 6,461,802; U.S. 6,828,401; U.S. 6,858,736; U.S. 2001/0021763; U.S. 2001/0044526; U.S. 2001/0046481; U.S. 2002/0052430; U.S. 2002/0072573; U.S. 2002/0156047; U.S. 2003/0114647; U.S. 2003/0143596; U.S. 2003/0158333; U.S. 2003/0220447; U.S. 2004/0013637; US 2004/0235734; WO0500360; U.S. 2005/0114037; U.S. 2005/0171328; U.S. 2005/0209416; EP 01064951; EP 0822199; WO 00176640; WO 0002017; WO 0249673; WO 9428024; y WO 0187925).

En un ejemplo, el polietilenglicol tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 3 kD a aproximadamente 50 kD, y típicamente de aproximadamente 5 kD a aproximadamente 30 kD. La unión covalente del PEG al fármaco (conocido como "PEGilación") se puede lograr mediante técnicas de síntesis química conocidas. Por ejemplo, la PEGilación de proteína se puede lograr haciendo reaccionar PEG activado por NHS con la proteína en condiciones de reacción adecuadas.

Si bien se han descrito numerosas reacciones para PEGilación, las que son más en general aplicables confieren direccionalidad, usan condiciones de reacción suave y no requieren un procesamiento posterior extenso para eliminar catalizadores o biproductos tóxicos. Por ejemplo, PEG monometoxi (mPEG) tiene solo un hidroxilo terminal reactivo y, por lo tanto, su uso limita parte de la heterogeneidad de la mezcla de producto de proteína PEG resultante. La activación del grupo hidroxilo en el extremo del polímero opuesto al grupo metoxi terminal es EN general necesaria para lograr una PEGilación de proteína eficiente, con el objetivo de hacer que PEG derivado sea más susceptible al ataque nucleofílico. El nucleófilo atacante es en general el grupo épsilon-amino de un residuo de lisilo, pero otras aminas también pueden reaccionar (*por* ejemplo, la alfa-amina del extremo N-terminal o las aminas del anillo de histidina) si las condiciones locales son favorables. Es posible una unión más dirigida en proteínas que contienen una lisina o cisteína individual. Este último residuo se puede dirigir mediante PEG-maleimida para modificación específica de tiol. De manera alternativa, el PEG hidrolizado se puede hacer reaccionar con una enzima degradadora de hialuronano oxidada con periodato y reducirse en la presencia de $NaCNBH_3$. Más específicamente, los azúcares CMP PEGilados se pueden hacer reaccionar con una enzima degradadora de hialuronano en la presencia de glicosil-transferasas apropiadas. Una técnica es la técnica de “PEGilación” donde un número de moléculas poliméricas se acoplan al polipéptido en cuestión. Cuando se utiliza esta técnica, el sistema inmunitario tiene dificultades

para reconocer los epítopos en la superficie del polipéptido responsables de la formación de anticuerpos, reduciendo de esta manera la respuesta inmunitaria. Para que los polipéptidos introducidos directamente en el sistema circulatorio del cuerpo humano proporcionen un efecto fisiológico particular (*es* decir, productos farmacéuticos), la respuesta inmunitaria potencial habitual es una respuesta de IgG y/o IgM, mientras que los polipéptidos que se inhalan a través del sistema respiratorio (*es* decir, polipéptido industrial) potencialmente pueden causar una respuesta de IgE (*es* decir, respuesta alérgica). Una de las teorías que explican la respuesta inmunitaria reducida es que las moléculas poliméricas protegen los epítopos en la superficie del polipéptido responsable de la respuesta inmunitaria que conduce a la formación de anticuerpos. Otra teoría o al menos un factor parcial es que cuanto más pesado es el conjugado, se obtiene una respuesta inmunitaria más reducida.

Habitualmente, para producir el polipéptido de u-PA modificado PEGilado proporcionado en la presente, las porciones PEG se conjugan, mediante unión covalente, a los polipéptidos. Los polipéptidos de u-PA modificados para PEGilación se pueden preparar sin el reemplazo de C122S; en cambio, el C122 puede servir como un sitio para conjugar a una porción PEG y/o para formar un enlace de disulfuro deseado, tal como para una forma activada de dos cadenas o un dímero.

Las técnicas para PEGilación incluyen, pero no se limitan a, ligadores especializados y químicas de acoplamiento (ver, *por* ejemplo, Harris, *Adv*. *Drug Deliv. Rev*. 54:459-476, 2002), unión de múltiples porciones PEG a un sitio de conjugación individual (tal como mediante el uso de PEG ramificados; ver, *por* ejemplo, Veronese *et al*., *Bioorg*. *Med. Chem.* Lett. 12:177-180, 2002), PEGilación y/o mono-PEGilación específica del sitio (ver, *por* ejemplo Chapman *et al*. *Nature Biotech*. 17:780-783, 1999) y PEGilación enzimática dirigida al sitio (ver, *por* ejemplo, Sato, *Adv*. *Drug Deliv. Rev*., 54:487-504, 2002). Los métodos y técnicas descritos en la técnica pueden producir proteínas que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 derivadas de PEG o PEG unidos a una molécula de proteína individual (véase, *por* ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos No. 2006/0104968).

b. Proteínas de fusión y otros conjugados

Se proporcionan en la presente conjugados de u-PA y los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente. Los conjugados de ejemplo son las proteínas de fusión ejemplificadas en los Ejemplos 14-16. Como se describe en la presente, algunos de los conjugados cuando se activan mediante escisión de un polipéptido de activación incluido forman un polipéptido de u-PA activado de dos cadenas; otros, tal como aquellos que contienen dominios F_c, pueden formar dos cadenas a través de la unión de los dominios F_c. Otros contienen secuencias, tales como SUMO y HIS-SUMO que facilitan la expresión y el

aislamiento/purificación. Los ejemplos 14 y 15, y también las Figuras 1-4, describen y representan conjugados resultantes. Para su uso como productos farmacéuticos, los polipéptidos de u-PA modificados en general se proporcionan en forma activada, tal como una forma activada de dos cadenas. Se entiende que el siguiente análisis describe los polipéptidos de fusión que pueden incluir secuencias señal y otras secuencias reguladoras que no aparecerán en el producto como se produce. En particular, los polipéptidos de fusión pueden incluir secuencias de activación, mediante las cuales tras la escisión, el polipéptido resultante es un polipéptido activado de dos cadenas. Son las formas activadas de los polipéptidos que, en general, serán el producto farmacéutico administrado a un sujeto.

i. Proteínas de fusión de ejemplo y otros conjugados de proteínas

Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente se pueden fusionar con otros polipéptidos y porcines de los mismos y con porciones para conferir propiedades deseadas, tal como semivida en suero aumentada y/o inmunogenicidad reducida y/u otras propiedades. Estos incluyen, por ejemplo, fusión a albúmina, fusión a porciones de direccionamiento, tal como anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, fusión a inmunoglobulinas, fusiones de Fc, modificación de patrones de glicosilación, farnesilación y otras modificaciones de este tipo (ver, Strohl (2015) *BioDrugs* 29:215-239 para una revisión de una variedad de proteínas de fusión para mejorar las propiedades farmacocinéticas de proteínas terapéuticas). Cualquiera de las modalidades para alterar las propiedades farmacológicas de productos terapéuticos se puede aplicar a los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente. En general, cuando la modificación es un polipéptido o porción del mismo, el u-PA modificado se produce como una proteína de fusión. Para modificaciones no polipépticas, tal como pegilación, la modificación se efectúa en proteína aislada. Los polipéptidos de u-PA modificados incluyen aquellos que tienen Cys en el residuo 122 (por número de quimotripsina), para proporcionar sitios para modificación de postraducción o postpurificación. Los polipéptidos de u-PA modificados incluyen aquellos que son porciones de longitud completa y catalíticamente activas de los mismos, tal como el dominio de proteasa, o el polipéptido maduro o el polipéptido de dos cadenas activado.

También se proporcionan proteínas de fusión que contienen un polipéptido de u-PA modificado proporcionado en la presente y uno o más polipéptidos adicionales. Se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen las proteínas de fusión formuladas para administración por una vía adecuada. Las proteínas de fusión se forman al enlazar en cualquier orden un polipéptido de u-PA modificado y otro polipéptido, tal como un anticuerpo o fragmento del mismo, factor de crecimiento, receptor, ligando y otro agente de este tipo con el fin de facilitar la purificación de una proteasa, alterar las propiedades farmacodinámicas de

un polipéptido de u-PA modificado al dirigir el polipéptido de u-PA a una célula o tejido diana y/o aumentar la expresión o secreción de un polipéptido de u-PA. Dentro de una proteína de fusión de polipéptido de u-PA, el polipéptido de u-PA puede ser la totalidad o una porción catalíticamente activa del mismo de un polipéptido de u-PA o la porción catalíticamente activa de un polipéptido de u-PA y una porción adicional de u-PA que no es u-PA de longitud completa. Las proteínas de fusión proporcionadas en la presente retienen sustancialmente toda su especificidad y/o selectividad para proteína C3 de complemento. En general, los polipéptidos de fusión de u-PA retienen al menos aproximadamente 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% de especificidad y/o selectividad del sustrato en comparación con un polipéptido de u-PA sin fusión, que incluye 96%, 97%, 98%, 99% o más especificidad del sustrato en comparación con un polipéptido de u-PA sin fusión.

ii. **Generación de construcción**

Una proteína de fusión de u-PA se puede producir por técnicas recombinantes estándar. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican para las diferentes secuencias de polipéptidos se pueden ligar entre sí dentro del marco de acuerdo con técnicas convencionales, *por ejemplo,* empleando extremos de extremo romo o extremo escalonado para la ligadura, digestión enzimática de restricción para proporcionar extremos apropiados, relleno de extremos cohesivos según corresponda, tratamiento de fosfatasa alcalina para evitar la unión no deseada y ligadura enzimática. En otra modalidad, el gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de gen se puede llevar a cabo usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos de gen consecutivos que posteriormente se pueden recocer y reamplificar para generar una secuencia génica quimérica (ver, *por* ejemplo, Ausubel *et al*. (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992). Muchos vectores de expresión están comercialmente disponibles que codifican para una porción de fusión (*por ejemplo,* una etiqueta His, polipéptido SUMO o polipéptido GST). Un ácido nucleico que codifica para u-PA se puede clonar en un vector de expresión tal que la porción de fusión se une dentro del marco al polipéptido de u-PA.

Los vectores de expresión de ejemplo incluyen cualquier vector de expresión de mamífero tal como, por ejemplo, pCMV. Para la expresión bacteriana, estos vectores incluyen pBR322, pUC, pSKF, pET23D y vectores de fusión tal como MBP, GST y LacZ. Otros vectores eucariotas, por ejemplo, cualquiera que contenga elementos reguladores de virus eucariotas, se pueden usar como vectores de expresión eucariotas. Estos incluyen, por ejemplo, vectores SV40, vectores del virus del papiloma y vectores derivados del virus Epstein-Bar. Los vectores

eucariotas de ejemplo incluyen pMSG, pAV009/A+, pMT010/A+, pMAMneo-5, baculovirus pDSCE y cualquier otro vector que permita la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor CMV, promotor temprano SV40, promotor tardío SV40, promotor de metalotioneína, promotor de virus de tumor mamario murino, promotor de virus de sarcoma de Rous, promotor de poliedro u otros promotores que se muestran eficaces para la expresión en eucariotas.

iii. Secuencia de señal

Las proteínas de fusión de u-PA pueden contener un péptido de señal (SP o secuencia de señal o señal de localización o péptido líder) para dirigir el transporte de la proteasa. Los péptidos de señal son motivos de secuencia que se encuentran en el extremo N-terminal de proteínas nacientes que se dirigen a proteínas para su translocación a través de la membrana del retículo endoplásmico a su destino específico dentro de la célula, o fuera de la célula si las proteínas van a ser secretadas. Por lo tanto, la selección y modificación de SP influye en el direccionamiento de proteínas (Zhang *et al*. *(*2005) *J Gene Med* 7:354-365). Se han desarrollado SP optimizados para una actividad más eficiente. Se han desarrollado modelos y algoritmos computacionales para predecir la eficacia de SP y definir secuencias de consenso de SP (Burdukiewicz et al. (2018) Int J Mol Sci 19(12): 3709; Peason et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 85*:2444-2448).

Se sabe que varias proteínas tienen SP, que incluyen, pero no se limitan a: receptores (nuclear, 4 transmembrana, proteína G acoplada y tirosina cinasa), citocinas (quimiocinas), hormonas (factores de crecimiento y diferenciación), neuropéptidos y vasomediadores, proteínas cinasas, fosfatasas, fosfolipasas, fosfodiesterasas, nucleótidos ciclasas, moléculas de matriz (adhesión, cadherina, moléculas de matriz extracelular, integrina y selectina), proteínas G, canales iónicos (calcio, cloruro, potasio y sodio), proteasas, transportador/bombas (aminoácido, proteína, azúcar, metal y vitamina; calcio, fosfato, potasio y sodio) y proteínas reguladoras. En algunos ejemplos, el péptido señal original se optimiza para la secreción de la proteína en la célula hospedadora deseada seleccionada para la producción. Un polipéptido de u-PA, tal como un dominio de proteasa de u-PA modificado proporcionado en la presente, se puede fusionar, directa o indirectamente, a un péptido señal no de uPA para dirigirse a u-PA.

Los péptidos señal pueden ser péptidos señal de anticuerpos tal como los péptidos señal de las cadenas pesadas de anticuerpos y la cadena ligera de anticuerpos. El isotipo del anticuerpo puede comprender, pero no se limita a, IgG, IgM, IgD, IgA e IgE. Por lo tanto, la cadena pesada puede comprender cadenas pesadas gamma, mu, delta, alfa y épsilon, y la cadena ligera puede comprender una cadena ligera kappa o lambda. Las proteínas de fusión de u-PA expuestas en la presente se pueden preparar con un péptido de señal de anticuerpo

tal como la secuencia de péptido de señal líder de kappa (κ) de cadena ligera de inmunoglobulina humana, tal como la secuencia de señal expuesta en SEQ ID NO: 999.

Otros péptidos señal de ejemplo son aquellos derivados de interleucina-2 humana (IL-2) que se utilizan ampliamente para investigación y producción de proteínas (Bamford *et al*. (1998) *J Immunol* 160:4418; Komada *et al*. (1999) *Biol Pharm Bull* 22:846). Se han desarrollado IL-2 SP modificados con mayor basicidad e hidrofobicidad que aumentaron la secreción de proteínas fusionadas hasta 3.5 veces (Zhang *et al.* (2005) *J. Gene Med.* 7:354). Las proteínas de fusión de u-PA en la presente se pueden preparar, por ejemplo, con un péptido de señal de IL-2, tal como el péptido de señal de IL2 humano (hIL2SP), tal como, por ejemplo, la secuencia de señal expuesta en SEQ ID NO: 1000.

Las proteínas de fusión de u-PA de ejemplo establecidas en la presente pueden contener un péptido de señal para dirigir el transporte de la proteasa. Por ejemplo, los polipéptidos de fusión de u-PA expuestos como SEQ ID Núms:1004, 1005, 1010, 1011, 1014-1018, 1036 y 1040 contienen una secuencia de péptidos de señal líder de kappa (κ) de cadena ligera de inmunoglobulina humana (SEQ ID NO: 999). En otro ejemplo, los polipéptidos de fusión de u-PA expuestos como SEQ ID Núms:1006-1009, 1012, 1013, 1034 y 1035 contienen una secuencia de péptidos de señal IL2 humano (hIL2SP) (SEQ ID NO: 1000).

iii. Proteínas de fusión y enlazadores de péptidos de ejemplo

El enlace de un polipéptido de u-PA modificado y otro polipéptido se puede efectuar directa o indirectamente mediante un ligador. En un ejemplo, el enlace puede ser mediante enlace químico, tal como mediante agentes heterobifuncionales o enlaces tiol u otros enlaces de este tipo. La fusión de un polipéptido de u-PA a otro polipéptido puede ser al extremo N-terminal o C-terminal del polipéptido de u-PA modificado, tal como el dominio de proteasa de u-PA modificado. Los ejemplos no limitantes de polipéptidos que se pueden utilizar en proteínas de fusión con un polipéptido de u-PA proporcionado en la presente incluyen, por ejemplo, un dominio Fc de inmunoglobulina G, albúmina de suero (*es* decir, albúmina de suero humana)), scFv que se une al colágeno IIm (C2scFv), dominio de unión a ácido hialurónico (HABD), polipéptido GST (glutatión S-transferasa), una etiqueta His (es decir, HHHHH), una etiqueta de modificador de tipo ubiquitina pequeña (SUMO), el polipéptido de etiqueta de hemaglutinina (HA) de influenza y su anticuerpo 12CA5 y/o una secuencia señal heteróloga (*por* ejemplo, de trombina o una región V-III de cadena kappy de Ig de ratón (IgGκ) o interleucina-2 humana (hIL2)). Las proteínas de fusión pueden contener componentes adicionales, tal como proteína de unión a maltosa *de E. coli* (MBP) que ayudan en la absorción de la proteína por las células (ver, Publicación de Solicitud Internacional PCT No. WO 01/32711).

Los ligadores peptídicos se pueden incluir en proteínas de fusión de u-PA. En un ejemplo, los ligadores peptídicos se pueden fusionar al extremo C-terminal de un primer polipéptido y el extremo N-terminal de un segundo polipéptido. Esta estructura se puede repetir múltiples veces de modo que al menos uno, y opcionalmente 2, 3, 4 o más polipéptidos se enlacen entre sí mediante ligadores peptídicos en sus respectivos extremos. Por ejemplo, una proteína de fusión puede incluir una secuencia X-Y-Z, donde X es el dominio catalítico de u-PA modificado o tipo silvestre, Y es un ligador peptídico y Z es todo o parte del compañero de fusión (*por ejemplo,* HSA, Fc, HABD o C2 scFv). En algunos casos, X es todo de un u-PA modificado que incluye el extremo N-terminal de u-PA y el dominio de proteasa de u-PA. En otros casos, X es parte de un u-PA modificado que incluye los 12 aminoácidos directamente anteriores del u-PA de dominio de proteasa y el u-PA de dominio de proteasa. En otro ejemplo, el polipéptido puede incluir la secuencia A-X-Y-Z, donde "A" es otro compañero de fusión, tal como un polipéptido, tal como SUMO o HIS-SUMO, que facilita la expresión y/o aislamiento del polipéptido resultante.

Los ligadores peptídicos en general incluyen Gly, Ser y combinaciones de los mismos, o Ala y Prolina. Los ligadores en general contienen de dos a 20 o 25 residuos. Ejemplos de ligadores peptídicos incluyen, pero no se limitan a: —Gly-Gly—, GSG, AGS (SEQ ID NO: 1003), GGGGS (SEQ ID NO:1001), GGSSGG (SEQ ID NO:1002), SSSSG (SEQ ID NO:1024), GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO:1025), GGSTSGSGKSSEGKG (SEQ ID NO: 1026), GSTSGSGKSSSEGSGSTKG (SEQ ID NO: 1027), GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 1028), EGKSSGSGSESKEF (SEQ ID NO: 1029), o AlaAlaProAla o (AlaAlaProAla)n (SEQ ID NO:1030), donde n es 1 a 6, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Las porciones de unión se describen, por ejemplo, en Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 85:5879-5883, Whitlow *et al*. (1993) *Protein Engineering* 6:989-995, y Newton *et al*., (1996) *Biochemistry* 35:545-553. Otros ligadores peptídicos adecuados incluyen cualquiera de aquellos descritos en las Patente de Estados Unidos No. 4,751,180 o 4,935,233. Un polinucleótido que codifica para un ligador peptídico deseado se puede insertar entre, y en el mismo marco de lectura que un polinucleótido que codifica todo o parte de un u-PA que incluye el u-PA de dominio de proteasa, usando cualquier técnica convencional adecuada. En un ejemplo, la proteína de fusión contiene un polipéptido de u-PA, por ejemplo, un dominio de proteasa de u-PA y un compañero de fusión, tal como HSA, Fc, HABD o C2 scFv, separado por uno o más ligadores peptídicos.

Los ejemplos de polipéptidos de fusión de u-PA incluyen un ligador en el extremo C-terminal del dominio de proteasa de u-PA que une el dominio de proteasa de u-PA a un compañero de fusión de extremo C-teminal, tal como moléculas de ligador de u-PA-Fc y u-

PA-HSA de HSA o HSA de HSA o Fc. opcionalmente pueden contener una etiqueta de epítopo y/o una señal para expresión y secreción. Una proteína de fusión de ligador-Fc de u-PA de ejemplo se expone en SEQ ID NO: 1018, que contiene secuencia de péptido de señal líder de kappa (κ) de cadena ligera de inmunoglobulina humana (SEQ ID NO: 999), HIS-SUMO (SEQ ID NO: 990), un u-PA de dominio de proteasa (SEQ ID NO: 21), un ligador (SEQ ID NO: 1002) y un fragmento Fc del cadena pesada de IgG1 humana (SEQ ID NO:992).

En otros ejemplos, las proteínas de fusión de u-PA de ejemplo son polipéptidos de fusión de u-PA-ligador-HSA, tal como las proteínas de fusión expuestas como SEQ ID Núms:1015-1017. Por ejemplo, el polipéptido de fusión expuesto en SEQ ID NO:1015 contiene secuencia de péptidos de señal líder de kappa (κ) de cadena ligera de inmunoglobulina humana (SEQ ID NO: 999), el dominio de extremo N-terminal de u-PA (SEQ ID NO: 1042), la secuencia de activación de u-PA tipo silvestre (SEQ ID NO: 997), un u-PA de dominio de proteasa (SEQ ID NO: 987), un ligador (SEQ ID NO: 1002), y HSA (SEQ ID NO:991). En otro ejemplo, el polipéptido de fusión expuesto en SEQ ID NO:1016 contiene secuencia de péptidos de señal líder de kappa (κ) de cadena ligera de inmunoglobulina humana (SEQ ID NO: 999), un sitio de activación de furina en la secuencia de activación de u-PA (SEQ ID NO:996), un u-PA de dominio de proteasa (SEQ ID NO: 21), un ligador (SEQ ID NO: 1002), y HSA (SEQ ID NO:991). En otro ejemplo, el polipéptido de fusión expuesto en SEQ ID NO:1017 contiene secuencia de péptidos de señal líder de kappa (κ) de cadena ligera de inmunoglobulina humana (SEQ ID NO: 999), HIS-SUMO (SEQ ID NO: 990), un u-PA de dominio de proteasa (SEQ ID NO: 21), un ligador (SEQ ID NO: 1002), y HSA (SEQ ID NO:991).

En otros ejemplos, el ligador se encuentra en el extremo N-terminal del u-PA de dominio de proteasa y une el dominio de proteasa a un compañero de fusión de extremo N-terminal. Por ejemplo, la proteína de fusión puede contener un Fc de extremo N-terminal unido a u-PA. Un polipéptido de fusión de FC-ligador-u-PA de ejemplo se expone en SEQ ID NO: 1004, que contiene secuencia de péptido de señal líder de kappa (κ) de cadena ligera de inmunoglobulina humana (SEQ ID NO: 999), un fragmento Fc de la cadena pesada de IgG1 humana (SEQ ID NO:992), un ligador (SEQ ID NO: 1003), la secuencia de activación de u-PA tipo silvestre (SEQ ID NO: 997) y un u-PA de dominio de proteasa (SEQ ID NO:987).

iv. Compañeros de fusión

Las proteínas de fusión, tal como proteínas de fusión que contienen fusión a Fc, fusión a albúmina de suero humano (HSA), fusión a un anticuerpo variable de fragmento de cadena simple (scFv), tal como scFv que se une al colágeno II (C2scFv), fusión a HABD y fusión a otros polipéptidos, son modificaciones conocidas para mejorar la farmacocinética de péptidos o fármacos biológicos. También entre estos se encuentra la conjugación con

monometoxipolietilenglicol (PEG) de cadena lineal o ramificada, lo que resulta en aumentos en la masa molecular y el radio hidrodinámico, y una disminución en la velocidad de filtración glomerular por el riñón. Otro enfoque para mejorar los parámetros farmacocinéticos incluye la modificación de patrones de glicosilación, dando como resultado un aclaramiento reducido y la extensión de la semivida.

Los polipéptidos de fusión de u-PA de ejemplo incluyen la colocación del extremo N-terminal del compañero de fusión (*es decir,* HSA, HABD, scFv o Fc) al u-PA de dominio de proteasa o extremo C-terminal al u-PA de dominio de proteasa. Una proteína de fusión de u-PA de ejemplo donde el compañero de fusión es N-terminal al u-PA de dominio de proteasa se expone en SEQ ID NO: 1004. Las proteínas de fusión de u-PA de ejemplo donde el compañero de fusión es C-terminal al u-PA de dominio de proteasa se exponen en SEQ ID Núms: 1006-1018.

(a) Dominio Fc

Algunos ejemplos de proteínas de fusión de u-PA incluyen la cadena pesada de un polipéptido de inmunoglobulina, más usualmente los dominios constantes de la cadena pesada. Las secuencias de ejemplo de regiones constantes de cadena pesada para subtipos de IgG humana se exponen en SEQ ID NO: 45 (IgG1), SEQ ID NO: 1020 (IgG2), SEQ ID NO: 1021 (IgG3) y SEQ ID NO: 1022 (IgG4). Por ejemplo, para la región constante de cadena pesada de ejemplo expuesta en SEQ ID NO: 45, el dominio C_H1 corresponde a aminoácidos 1-98, la región bisagra corresponde a aminoácidos 99-110, el dominio C_H2 corresponde a aminoácidos 111-223 y el dominio CH3 corresponde a aminoácidos 224-330.

En un ejemplo, una proteína de fusión de u-PA puede incluir la región Fc de un polipéptido de inmunoglobulina, tal como inmunoglobulina humana. Habitualmente, esta fusión retiene al menos una bisagra funcionalmente activa, dominios C_H2 y C_H3 de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. Por ejemplo, una secuencia Fc de longitud completa de IgG1 incluye aminoácidos 105-330 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 45. Las secuencias de Fc de ejemplo para hIgG1 se exponen en SEQ ID NO: 992 y 1023, y contienen casi toda la secuencia bisagra que corresponde a aminoácidos 100-110 de SEQ ID NO:45, y la secuencia completa para el dominio C_H2 y C_H3 como se expone en SEQ ID NO:45. Otro polipéptido Fc de ejemplo se expone en la solicitud PCT WO 93/10151, y es un polipéptido de cadena simple que se extiende desde la región bisagra del extremo N-terminal hasta el extremo C-termianl nativo de la región Fc de un anticuerpo IgG1 humano (SEQ ID NO:50). El sitio preciso en el que se realiza el enlace no es crítico: los sitios particulares son bien conocidos y se pueden seleccionar con el fin de optimizar la actividad biológica o estabilidad del polipéptido de u-PA. Por ejemplo, otras secuencias de polipéptidos de Fc de

ejemplo comienzan en el aminoácido C109 o P113 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 45 (ver, por ejemplo, publicación de Estados Unidos No. 2006/0024298).

Además de hIgG1 Fc, también se pueden incluir otras regiones Fc en las proteínas de fusión de u-PA proporcionadas en la presente. Por ejemplo, cuando las funciones efectoras mediadas por interacciones Fc/FcγR se deben minimizar, se contempla la fusión con isotipos de IgG que reclutan células efectoras o complemento de forma deficiente, tal como, por ejemplo, la Fc de IgG2 o IgG4. Además, las fusiones Fc pueden contener secuencias de inmunoglobulina que están sustancialmente codificadas por genes de inmunoglobulina pertenecientes a cualquiera de las clases de anticuerpos, incluyendo, pero no limitado a IgG (incluyendo subclases humanas IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), IgA (incluyendo subclases humanas IgA1 e IgA2), IgD, IgE e IgM clases de anticuerpos. Además, los ligadores se pueden usar para unir covalentemente Fc a otro polipéptido para generar una quimera de Fc.

Los dominios de Fc modificados también se contemplan en la presente para su uso en quimeras con polipéptidos de u-PA de fusión. En algunos ejemplos, la región Fc se modifica de modo que exhiba unión alterada a un FcR de modo que tenga como resultado una función efectora alterada (*es* decir, más o menos) que la función efectora de una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina tipo silvestre. Por lo tanto, un dominio Fc modificado puede tener afinidad alterada, incluyendo pero no limitado a, afinidad aumentada o baja o nula para el receptor Fc. Por ejemplo, las diferentes subclases de IgG tienen diferentes afinidades por las FcγR, con IgG1 e IgG3 que habitualmente se unen de forma sustancial mejor a los receptores que IgG2 e IgG4. Diferentes FcγR median diferentes funciones efectoras. FcγR1, FcγRIIa/c y FcγRIIIa son reguladores positivos de activación activada por complejo inmunitario, caracterizados por tener un dominio intracelular que tiene un motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM). FcγRIIb, sin embargo, tiene un motivo de inhibición de inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) y, por lo tanto, es inhibidor. En algunos casos, una proteína de fusión de polipéptido de u-PA Fc proporcionada en la presente se puede modificar para mejorar la unión a la proteína de complemento C1q. Además, una Fc se puede modificar para alterar su unión a FcRn, mejorando de esta manera la farmacocinética de un polipéptido de fusión de u-PA-Fc. Por lo tanto, alterar la afinidad de una región Fc para un receptor puede modular las funciones efectoras y/o propiedades farmacocinéticas asociadas por el dominio Fc. Los dominios Fc modificados son conocidos por un experto en la técnica y se describen en la literatura, ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos No. 5,457,035; Publicación de Patente de Estados Unidos No. US 2006/0024298; y Publicación Internacional de Patente No. WO 2005/063816 para modificaciones de ejemplo.

En algunos ejemplos, se forma un multímero polipéptido de u-PA. Habitualmente, un multímero de polipéptido es un dímero de dos proteínas quiméricas creadas mediante el enlace, directa o indirectamente, de dos polipéptidos de u-PA iguales o diferentes, tal como un dominio de proteasa de u-PA, a un polipéptido Fc. En algunos ejemplos, una fusión génica que codifica para la proteína de fuside u-PA-Fc se inserta en un vector de expresión adecuado. Las proteínas de fusión de u-PA-Fc resultantes se pueden expresar en células hospedadoras transformadas con el vector de expresión recombinante, y se les permite ensamblar moléculas de anticuerpo similares, donde se forman enlaces disulfuro intercadena entre las porciones Fc para proporcionar polipéptidos de u-PA divalentes.

Los polipéptidos de fusión de u-PA que contienen regiones Fc también se pueden modificar para incluir una etiqueta con quelatos metálicos u otro epítopo. El dominio etiquetado se puede usar para purificación rápida mediante cromatografía de quelato metálico y/o mediante anticuerpos, para permitir la detección de Transferencia Western, inmunoprecipitación o agotamiento/bloqueo de actividad en bioensayos.

Los polipéptidos de fusión de u-PA-Fc de ejemplo incluyen fusión del u-PA de dominio de proteasa y Fc. Las proteínas de fusión de u-PA -Fc de ejemplo se exponen en SEQ ID Núms: 1004, 1006, 1010, 1011, 1012 y 1018. Las moléculas de u-PA-Fc opcionalmente pueden contener una etiqueta de epítopo o una señal para expresión y secreción. Por ejemplo, los polipéptidos de fusión de u-PA -Fc de ejemplo expuestos como SEQ ID Núms:1004, 1010 y 1011 contienen secuencia de péptidos de señal líder de kappa (κ) de cadena ligera de inmunoglobulina humana (SEQ ID NO: 999), un fragmento Fc de la cadena pesada de IgG1 humana (SEQ ID NO:992) y un u-PA de dominio de proteasa (SEQ ID NO: 21 o 987) ya sea en el extremo N (SEQ ID NO:1004) o en el extremo C (SEQ ID Núms:1010 y 1011) al Fc. En otro ejemplo, los polipéptidos de fusión de u-PA -Fc de ejemplo expuestos como SEQ ID Núms:1006 y 1012 contienen secuencia de péptidos de señal IL2 humano (hIL2SP) (SEQ ID NO: 1000), un u-PA de dominio de proteasa (SEQ ID NO: 5 o 21) y un fragmento Fc del extremo N de cadena pesada de IgG1 humana (SEQ ID NO:992) al u-PA de dominio de proteasa.

(b) Albúmina de suero

Las proteínas de fusión de u-PA se pueden generar con albúmina como un compañero de fusión con el fin de aumentar la semivida, estabilidad, biodisponibilidad, distribución y/o mejorar la farmacocinética de u-PA. Numerosos productos enlazados a albúmina de suero humano (HSA) están aprobados para su uso como productos terapéuticos, incluido su uso como productos terapéuticos contra el cáncer y para el tratamiento de diabetes tipo 2 (AlQahtani *et al*. (2019) *Biomed and Pharmacotherapy* 113:108750; Roscoe et al.,

(2018) *Mol. Pharmaceutics* 151:15046-5047; Strohl, W.R. (2015) *BioDrugs* 4:215-239). En algunos ejemplos, la proteína HSA madura, que carece de la secuencia de señal y secuencia de activación, se fusiona a una proteína de interés. En algunos ejemplos de una proteína de fusión de u-PA, albúmina de suero, tal como albúmina de suero humano (HSA), se conjuga con u-PA, tal como el u-PA de dominio de proteasa. Una HSA de ejemplo se expone en SEQ ID NO: 991.

Los polipéptidos de fusión de u-PA-HSA incluyen fusión del u-PA de dominio de proteasa y HSA. Las proteínas de fusión de u-PA-HSA de ejemplo se exponen en SEQ ID Núms: Las moléculas de u-PA-HSA 1007 y 1013-1017.opcionalmente pueden contener una etiqueta de epítopo y/o una señal para expresión y secreción. Por ejemplo, los polipéptidos de fusión de u-PA -HSA de ejemplo expuestos como SEQ ID Núms:1014-1017 contienen secuencia de péptido de señal líder de kappa (κ) de cadena ligera de inmunoglobulina humana (SEQ ID NO: 999), un u-PA de dominio de proteasa (SEQ ID NO: 987 o 21), y una HSA de extremo C (SEQ ID NO:991). En otro ejemplo, el polipéptido de fusión de u-PA-HSA de ejemplo expuesto como SEQ ID NO:1013 contiene secuencia de péptidos de señal IL2 humano (hIL2SP) (SEQ ID NO: 1000), el u-PA de dominio de proteasa (SEQ ID NO:5) y una HSA de extremo C (SEQ ID NO:991).

(c) scFv que se une al colágeno II (C2scFv)

Los fragmentos de anticuerpo recombinantes en la forma de anticuerpos variables de fragmento de cadena simple (scFv), tal como un scFv que se une al colágeno II (C2scFv), se pueden usar como un compañero de fusión con anticuerpos de u-PA. scFv producidos a partir de la visualización de fagos se pueden fusionar con marcadores o proteínas activas o terapéuticas (Ahmad et al. (2012) Clin Dev Immunol 2012:980250). La fusión de scFvs se puede usar para aumentar el rendimiento y la actividad de proteínas conjugadas (Martin *et al.,* (2006) *BMC Biotech* 6:46).

Los anticuerpos variables de fragmento de cadena simple comprenden regiones variables de cadena pesada (V_H) y ligera (V_L) unidas por un ligador peptídico o enlace de disulfuro (Glockshuber *et al*. (1990) *Biochemistry* 29(6):1362–1367). El ligador peptídico juega un papel crítico en el plegado de la cadena de polipéptidos. Los ligadores comúnmente utilizados comprenden residuos Gly y Ser para flexibilidad o Glu y Lys para mejorar la solubilidad (Whitlow *et al*. (1993) *Protein Engineering* 6(8):989–995).

scFv se puede fusionar a proteínas para administración específica a células presentadoras de antígeno (Ahmad *et al*. (2012) Clin Dev Immunol 2012:980250). Por ejemplo, el scFv se puede generar para dirigirse al colágeno II, tal como para usos como agentes de investigación, y como un agente de administración de moléculas terapéuticas a

sitios que expresan colágeno II humano. Por ejemplo, el scFv es un anticuerpo monoclonal aislado o fragmento del mismo que se une al colágeno humano II, que comprende una región VH y una región VL, donde el C2scFv comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 993.

Los polipéptidos de fusión de u-PA-C2scFv de ejemplo incluyen fusión del u-PA de dominio de proteasa y C2scFv. Una proteína de fusión de u-PA-C2scFv de ejemplo se expone en SEQ ID NO: 1008. moléculas de u-PA- C2scFv opcionalmente pueden contener una etiqueta de epítopo o una señal para expresión y secreción. Por ejemplo, el polipéptido de fusión de u-PA-C2scFv de ejemplo expuesto como SEQ ID NO:1008 contiene una secuencia de péptido de señal IL2 humano (hIL2SP) (SEQ ID NO: 1000), un dominio de proteasa de u-PA (SEQ ID NO:21), y un C2scFv de extremo C (SEQ ID NO:993).

(d) Dominio de unión al ácido hialurónico (HABD)

En algunos ejemplos, las proteínas de fusión de u-PA contienen un compañero de fusión HABD, tal como Gene-6 estimulado por factor de necrosis tumoral (TSG-6), tal como el TSG-6 expuesto como SEQ ID NO: 994 (correspondiente a los aminoácidos 32-134 de TSG-6 humano; NCBI No. NP_009046.2). las proteínas de fusión de u-PA se pueden generar con un HABD, tal como TSG-6, como un compañero de fusión con el fin de aumentar la semivida, estabilidad, biodisponibilidad, distribución y/o mejorar la farmacocinética de u-PA.

Gene-6 estimulado por factor de necrosis tumoral (TSG-6, proteína 6 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa, TNFAIP6; NCBI No. NP_009046.2) es una glicoproteína secretada de ~35 kDa compuesta por un único módulo de enlace N-terminal y un dominio CUB C-terminal. La expresión de TSG-6 es inducida en muchos tipos de células por mediadores inflamatorios, incluyendo citocinas y factores de crecimiento. A través de su módulo de enlace, que se ha reportado que contiene aproximadamente aminoácidos 35-132, TSG-6 es un potente inhibidor de la migración de leucocitos polimorfonucleares. TSG-6 forma un complejo estable con el inhibidor de serina proteasa Inter-alfa-inhibidor (IαI) y potencia la actividad anti-plasmina de IαI. TSG-6 también es importante para la formación y remodelación de recubrimientos pericelulares ricos en HA y matrices extracelulares.

Los polipéptidos de fusión de u-PA-HABD de ejemplo incluyen fusión del u-PA de dominio de proteasa y HABD. Una proteína de fusión de u-PA-HABD de ejemplo se expone en SEQ ID NO: 1009. moléculas de u-PA-HABD pueden, opcionalmente, contener una etiqueta de epítopo o una señal para expresión y secreción. Por ejemplo, el polipéptido de fusión de u-PA- HABD de ejemplo expuesto como SEQ ID NO:1009 contiene una secuencia de péptido de señal IL2 humano (hIL2SP) (SEQ ID NO: 1000), un dominio de proteasa de u-PA (SEQ ID NO:21), y un HABD de extremo C (SEQ ID NO:994).

v. Sitios de Activación

Las proteínas de fusión de u-PA de ejemplo contienen un sitio para la activación de u-PA. Por ejemplo, las proteínas de fusión de u-PA comprenden secuencia de u-PA tipo silvestre para autoactivación; contienen secuencia de furina para activación durante la expresión de proteína; o se activan después de la escisión de la señal de secreción, todas generando la proteasa de u-PA activada.

(a) Furina

Las proteínas de furina han estado implicadas en el procesamiento de maduración endoproteolítica de proteínas precursoras inactivas en sitios de consenso básicos únicos, pareados o múltiples dentro de la vía secretora (Nakayama(1997) *Biochem*.J. 327:625-635; Seidah and Chretien, *Current Opinions in Biotechnology* (1997) 8:602-607). Tras el tránsito de una proteína precursora recién sintetizada desde el retículo endoplásmico al compartimiento Golgi, el propéptido se retira autocatalíticamente en un evento de procesamiento de dos pasos en un motivo de escisión de furina (Leduc *et al*. (1992) *J.Biol.Chem* 267:14304-14308; Anderson *et al*. (1997) *EMBO* 1508-1518). La furina requiere un sitio R-X-X-R para la escisión, y el procesamiento óptimo ocurre en un motivo R-X-K/R-R (Molloy *et al*. (1992) *J. Biol Chem* 267:16396-16402). Las secuencias de activación de u-PA de ejemplo, que contienen los sitios de escisión de RRKR de furina, se exponen en SEQ ID Nos: 995 y 996.

Las proteínas de fusión de u-PA pueden incluir un extremo N-terminal del sitio de activación de furina al u-PA de dominio de proteasa, de modo que la proteína de u-PA se activa durante la expresión. La activación de u-PA durante la expresión, tal como mediante la inclusión de un sitio de activación de furina en la secuencia de activación de u-PA, pretende eliminar la necesidad de un paso de activación durante el procesamiento posterior.

Se generaron polipéptidos de fusión de u-PA que incluyen un sitio de activación de furina y el u-PA de dominio de proteasa. Las proteínas de furina-u-PA de ejemplo se exponen en SEQ ID Núms: 1010, 1014 y 1016. Las moléculas de u-PA activadas con furina opcionalmente contienen un compañero de fusión y/o una señal para expresión y secreción. Por ejemplo, las proteínas de fusión de u-PA de ejemplo expuestas como SEQ ID NO:1014 y 1016 contienen secuencia de péptido de señal líder de inmunoglobulina humana (κ) (SEQ ID NO: 999), un sitio de activación de furina en la secuencia de activación de u-PA (SEQ ID NO: 995 o 996), el dominio de proteasa de u-PA (SEQ ID NO: 21 o 987), y HSA (SEQ ID NO:991). La proteína de fusión de u-PA expuesta como SEQ ID NO: 1014 contiene además el extremo N-terminal de u-PA (expuesto como aminoácidos 21-178 de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO: 1042), N-terminal al dominio de proteasa de furina-u-PA con el u-PA de dominio de proteasa expuesto en SEQ ID NO: 987. En otro ejemplo, proteína de fusión de u-PA expuesta como

SEQ ID NO:1010 contiene secuencia de péptidos de señal líder de kappa (κ) de cadena ligera de inmunoglobulina humana (SEQ ID NO: 999), un sitio de activación de furina en la secuencia de activación de u-PA (SEQ ID NO: 995), el dominio de proteasa de u-PA (SEQ ID NO: 21), y Fc (SEQ ID NO:992).

(b) u-Pa

La activación de zimógeno de u-PA ocurre mediante escisión de un único extremo N-terminal de enlace peptídico al dominio catalítico de u-PA, iniciando un cambio conformacional en las construcciones de u-PA generadas en la presente puede contener la secuencia de activación de u-PA de 12 aminoácidos (SEQ ID NO: 997) o una forma modificada del mismo (SEQ ID NO: 998) o puede contener una porción extendida del extremo N-terminal de u-PA que incluye la secuencia de activación, de modo que el u-PA comprende el polipéptido maduro de longitud completa, tal como el polipéptido expuesto en SEQ ID NO: 3. En otros ejemplos, el u-PA comprende el extremo N-terminal, tal como la región N-terminal de u-PA expuesto como aminoácidos 21-178 de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO: 1042 y la secuencia de activación de u-PA de 12 aminoácidos (SEQ ID NO: 997) o una forma modificada de la secuencia de activación de u-PA (SEQ ID NO: 998).

Se prepararon proteínas de fusión que contienen los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente. Se generaron polipéptidos de fusión de u-PA que incluyen el sitio de activación de u-PA modificado o tipo silvestre y el u-PA de dominio de proteasa. Las proteínas de u-PA de ejemplo que contienen la secuencia de activación de u-PA tipo silvestre para activación se exponen en SEQ ID Núms: 1004, 1005, 1011 y 1015. Los péptidos de fusión opcionalmente pueden contener un compañero de fusión y/o una señal para expresión y/o secreción. Por ejemplo, proteína de fusión de u-PA de ejemplo expuesta como SEQ ID NO:1004 contiene secuencia de péptidos líder de kappa (κ) de cadena ligera de inmunoglobulina (SEQ ID NO: 999), Fc (SEQ ID NO:992), la secuencia de activación de u-PA (SEQ ID NO:995) y el u-PA de dominio de proteasa (SEQ ID NO: 987). En un ejemplo adicional, proteína de fusión de u-PA expuesta como SEQ ID NO: 1005 contiene la secuencia de u-PA madura de longitud completa (SEQ ID NO: 3 con el dominio de proteasa modificado expuesto en SEQ ID NO: 987) y una secuencia de péptido de señal líder de kappa (κ) de cadena ligera de inmunoglobulina humana de extremo N (SEQ ID NO: 999). En un ejemplo adicional, proteína de fusión de u-PA expuesta como SEQ ID NO: 1011 y una secuencia de péptido de señal líder de kappa (κ) de cadena ligera de inmunoglobulina humana de extremo N (SEQ ID NO: 999), la secuencia de u-PA madura de longitud completa (SEQ ID NO: 3 con el dominio de proteasa modificado expuesto en SEQ ID NO: 987), y Fc (SEQ ID NO: 992). En otro ejemplo, la proteína de fusión de u-PA expuesta como SEQ ID NO:1015 contiene

secuencia de péptido de señal líder de kappa (κ) de cadena ligera de inmunoglobulina humana (SEQ ID NO: 999), el extremo N-terminal de u-PA (expuesto como aminoácidos 21-178 de SEQ ID NO:1) que incluye la secuencia de activación de u-PA, el dominio de proteasa de u-PA (SEQ ID NO: 987), y HSA (SEQ ID NO:991). Los polipéptidos de u-PA modificados, tal como aquellos de SEQ ID Núms. 1006, 1007, 1009 y 1010, tras la expresión, demostraron actividad de proteasa de u-PA. U-PA modificado con una secuencia de activación de furina N-terminal a u-PA con una fusión de Ig FC en el extremo C-terminal (tal como se expone en SEQ ID NO: 1010) mostraron la actividad más alta.

vi. Etiquetas de Purificación

Las proteínas de fusión de u-PA de ejemplo contienen una etiqueta para la purificación de la proteína de fusión de u-PA o u-PA. Las etiquetas de ejemplo para la purificación de proteínas de fusión de u-PA se exponen en la Sección F, anterior. Las proteínas de fusión de u-PA de ejemplo pueden comprender una secuencia de SUMO o His para purificación.

(a) Etiqueta His

Las proteínas de fusión de u-PA pueden incluir una etiqueta His, tal como ls 6xHis expuesta en SEQ ID NO: 989 y el dominio de proteasa de u-PA.

Se generaron polipéptidos de fusión de u-PA que incluyen una etiqueta de purificación de His y el u-PA de dominio de proteasa. Las proteínas de fusión de HIS-u-PA de ejemplo se exponen en SEQ ID Núms: 1017 y 1018. Las moléculas de u-PA etiquetadas con His opcionalmente pueden contener un compañero de fusión y/o una señal para expresión y secreción. Por ejemplo, proteína de fusión de His-u-PA de ejemplo expuesta como SEQ ID NO: 1017 contiene secuencia de péptido de señal líder de kappa (κ) de cadena ligera de inmunoglobulina humana (SEQ ID NO: 999), 6xHis (SEQ ID NO:989), SUMO (SEQ ID NO:1031), el dominio de proteasa de u-PA (SEQ ID NO: 21), y HSA (SEQ ID NO:991). En otro ejemplo, la proteína de fusión de u-PA etiquetada con His expuesta como SEQ ID NO: 1018 contiene secuencia de péptido de señal líder de kappa (κ) de cadena ligera de inmunoglobulina humana (SEQ ID NO: 999), 6xHis (SEQ ID NO:989), SUMO (SEQ ID NO:1031), el dominio de proteasa de u-PA (SEQ ID NO: 21), y Fc (SEQ ID NO:992).

(b) SUMO

Las proteínas de fusión de u-PA pueden incluir una etiqueta His y/o se pueden incluir secuencias de SUMO para acumulación en cuerpos de inclusión. Por ejemplo, la secuencia de HIS-SUMO expuesta en SEQ ID NO: 990 y el u-PA de dominio de proteasa pueden unirse al polipéptido de u-PA modificado de longitud completa, o a una porción catalíticamente activa del mismo, tal como al dominio proteasa, o a una porción más grande

del polipéptido de u-PA modificado. Se generaron polipéptidos de fusión de u-PA que incluyen etiquetas de His-SUMO y el u-PA de dominio de proteasa. Las proteínas de HIS-SUMO-u-PA de ejemplo se exponen en SEQ ID Núms: 1017 y 1018. Las moléculas de u-PA etiquetadas con His opcionalmente pueden contener un compañero de fusión y/o una señal para expresión y secreción. Por ejemplo, proteína de fusión de His-SUMO-u-PA expuesta como SEQ ID NO: 1017 contiene secuencia de péptido de señal líder de kappa (κ) de cadena ligera de inmunoglobulina humana (SEQ ID NO: 999), 6xHis (SEQ ID NO:989), SUMO (SEQ ID NO:1031), el dominio de proteasa de u-PA (SEQ ID NO: 21), y HSA (SEQ ID NO:991). En otro ejemplo, la proteína de fusión de His-SUMO-u-PA expuesta como SEQ ID NO: 1018 contiene secuencia de péptido de señal líder de kappa (κ) de cadena ligera de inmunoglobulina humana (SEQ ID NO: 999), 6xHis (SEQ ID NO:989), SUMO (SEQ ID NO:1031), el dominio de proteasa de u-PA (SEQ ID NO: 21), y Fc (SEQ ID NO:992).

7. Moléculas de ácido nucleico

En la presente se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican para polipéptidos de u-PA. Las moléculas de ácido nucleico incluyen variantes alélicas o variantes de empalme de cualquier polipéptido de u-PA codificado, o porción catalíticamente activa del mismo. En una modalidad, las moléculas de ácido nucleico proporcionadas en la presente tienen al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia con cualquier polipéptido de u-PA codificado por ácido nucleico o porción catalíticamente activa del mismo. En otra modalidad, una molécula de ácido nucleico puede incluir aquellos con secuencias de codones degeneradas de cualquiera de los polipéptidos de u-PA o porciones catalíticamente activas de los mismos, tal como aquellos proporcionados en la presente.

También se proporcionan moléculas de ácido nucleico o proteínas de fusión que contienen una porción catalíticamente activa de una molécula de ácido nucleico, unida operativamente a un promotor, tal como un promotor inducible para expresión en células de mamífero. Estos promotores incluyen, pero no se limitan a, promotores CMV y SV40; promotores de adenovirus, tal como el promotor del gen E2, que responde a la oncoproteína E7 del VPH; un promotor PV, tal como el promotor PBV p89 que responde a la proteína E2 PV; y otros promotores que son activados por el VIH o PV o oncogenes.

Una proteasa de u-PA proporcionada en la presente también se puede administrar a las células en vectores de transferencia génica. Los vectores de transferencia también pueden codificar para otros agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento de la enfermedad o trastorno, tal como artritis reumatoide o enfermedad cardiovascular o AMD o DGF, para los cuales se administra la proteasa. Los vectores de transferencia que codifican

para una proteasa se pueden usar sistémicamente, mediante la administración del ácido nucleico a un sujeto. Por ejemplo, el vector de transferencia puede ser un vector viral, tal como un vector de adenovirus. Los vectores que codifican para una proteasa también se pueden incorporar en células madre y las células madre se administran a un sujeto tal como mediante trasplante o injerto de células madre en sitios para terapia. Por ejemplo, las células madre mesenquimales (MSC) se pueden modificar para expresar una proteasa y las MSC se injertan en un sitio de trasplante para terapia.

G. COMPOSICIONES, FORMULACIONES Y DOSIFICACIONES

Las composiciones farmacéuticas que contienen polipéptidos de u-PA modificados, proteínas de fusión de u-PA modificadas o moléculas de ácido nucleico codificantes, se pueden formular de cualquier manera convencional al mezclar una cantidad seleccionada del polipéptido con uno o más portadores o excipientes fisiológicamente aceptables. En la mayoría de las modalidades, el polipéptido de u-PA modificado o proteína de fusión se encontrará en una forma activada en la composición para administración. Por lo tanto, por ejemplo, los polipéptidos serán formas activadas de dos cadenas o, donde la proteína de fusión contiene un dominio de multimerización, la proteína puede ser un multímero, tal como un dímero.

La selección del portador o excipiente está dentro de la habilidad del profesional que administra y puede depender de una serie de parámetros. Estos incluyen, por ejemplo, el modo de administración (*es decir,* modo sistémico, oral, nasal, pulmonar, local, tópico o cualquier otro modo) y trastorno tratado. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente se pueden formular para administración de dosis única (directa) o para dilución u otra modificación. Las concentraciones de los compuestos en las formulaciones son efectivas para la administración de una cantidad, luego de la administración, que es efectiva para el tratamiento previsto. Habitualmente, las composiciones se formulan para administración de dosis individual. Para formular una composición, la fracción en peso de un compuesto o mezcla de los mismos se disuelve, suspende, dispersa o de otro modo se mezcla en un vehículo seleccionado a una concentración efectiva de modo que la condición tratada se alivia o mejora. Los portadores o vehículos farmacéuticos adecuados para la administración de los compuestos proporcionados en la presente incluyen cualquiera de los portadores conocidos por aquellos expertos en la técnica como adecuados para el modo particular de administración.

1. Administración de polipéptidos de u-PA modificados

A los efectos de esta sección, los polipéptidos de u-PA modificados se refieren a polipéptidos de u-PA que contienen modificaciones, tal como los dominios de proteasa

modificados, e incluyen los conjugados, tal como proteínas de fusión. Los polipéptidos se pueden formular como el único ingrediente farmacéuticamente activo en la composición o se pueden combinar con otros ingredientes activos. Los polipéptidos se pueden dirigir para administración, tal como mediante conjugación a un agente de direccionamiento, tal como un anticuerpo. Suspensiones liposomales, que incluyen liposomas dirigidos a tejido, también pueden ser adecuados como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar formulaciones de liposomas como se describen en la Patente de Estados Unidos No. 4,522,811. La administración liposómica también puede incluir formulaciones de liberación lenta, que incluyen matrices farmacéuticas tal como geles de colágeno y liposomas modificados con fibronectina (ver, por ejemplo, Weiner *et al*. (1985) *J Pharm Sci.* 74(9): 922-5).

El compuesto activo se incluye en el portador farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil en la ausencia de efectos secundarios no deseables en el sujeto tratado. La concentración terapéuticamente eficaz se puede determinar empíricamente mediante la prueba de los compuestos en sistemas conocidos *in vitro* e *in vivo*, tal como los ensayos proporcionados en la presente.

Los polipéptidos de u-PA proporcionados en la presente (*es* decir, compuestos activos) se pueden administrar *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* poniendo en contacto una mezcla, tal como un fluido corporal u otra muestra de tejido, con un polipéptido de u-PA proporcionado en la presente, que incluye cualquiera de los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente. Por ejemplo, cuando se administra un compuesto *ex vivo*, un fluido corporal, tal como la muestra vítrea o de tejido de un sujeto se puede poner en contacto con los polipéptidos de u-PA que se recubren en un tubo o filtro, tal como, por ejemplo, un verdadero o filtro en una máquina de derivación. Cuando se administran *in vivo*, los compuestos activos se pueden administrar por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por vía oral, nasal, pulmonar, parenteral, intravenosa, intradérmica, intravítrea, intrarretiniana, subretiniana, periocular, subcutánea o tópica, en forma líquida, semilíquida o sólida y se formulan de una manera adecuada para cada vía de administración. La determinación de la dosis está dentro de la habilidad del médico y puede ser una función del trastorno particular, la vía de administración y el sujeto. Las dosificaciones de ejemplo incluyen, por ejemplo, 0.1-1 mg.

El polipéptido de u-PA modificado y sales y solvatos fisiológicamente aceptables se pueden formular para administración por inhalación (ya sea a través de la boca o la nariz), administración oral, transdérmica, pulmonar, parenteral o rectal. Para la administración por

inhalación, el polipéptido de u-PA modificado se puede administrar en forma de una presentación en aerosol de paquetes presurizados o un nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, *por* ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclortetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosis se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, *por ejemplo,* gelatina para su uso en un inhalador o insuflador, se pueden formular que contienen una mezcla en polvo de un compuesto terapéutico y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Para la administración pulmonar a los pulmones, el polipéptido de u-PA modificado se puede administrar en forma de una presentación en aerosol de un nebulizador, turbonebulizador o inhalador oral de dosis medida controlada por microprocesador con el uso de un propulsor adecuado. En general, el tamaño de partícula del aerosol es pequeño, tal como en el intervalo de 0.5 a 5 micrómetros. En el caso de una composición farmacéutica formulada para administración pulmonar, los tensioactivos detergentes no se usan habitualmente. La administración de fármacos pulmonares es un método prometedor no invasivo de administración sistémica. Los pulmones representan una vía atractiva para la administración de fármacos, principalmente debido a la alta superficie para la absorción, epitelio alveolar delgado, vascularización extensa, falta de metabolismo hepático de primer paso y actividad metabólica relativamente baja.

Para administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, tabletas, píldoras, suspensiones líquidas o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tal como agentes de unión (*por ejemplo,* almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); rellenos (*por ejemplo,* lactosa, celulosa microcristalina o fosfato de hidrógeno de calcio); lubricantes (*por* ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); desintegrantes (*por ejemplo,* almidón de papa o glicolato de almidón de sodio); o agentes humectantes (*por ejemplo,* laurilsulfato de sodio). Las tabletas se pueden recubrir por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Estas preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tal como agentes de suspensión (*por ejemplo,* jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (*por ejemplo,* lecitina o acacia); vehículos no acuosos (*por ejemplo,* aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservadores (*por*

ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales amortiguadoras, agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes según corresponda.

Las preparaciones para administración oral se pueden formular para liberación controlada del compuesto activo. Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de tabletas o grageas formuladas de manera convencional.

Los polipéptidos de u-PA modificados se pueden formular como una preparación de depósito. Las formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, los compuestos terapéuticos se pueden formular con materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble.

El polipéptido de u-PA modificado se puede formular para administración parenteral mediante inyección (*por ejemplo,* mediante inyección en bolo o infusión continua). Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosis unitaria (*por ejemplo,* en ampollas o en contenedores multidosis) con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tal como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersantes. De manera alternativa, el ingrediente activo se puede encontrar en forma liofilizada en polvo para su constitución con un vehículo adecuado, *por* ejemplo, agua estéril libre de pirógeno, antes de su uso.

Los polipéptidos de u-PA modificados se pueden formular para administración ocular u oftálmica. La administración ocular de fármacos puede ser, por ejemplo, tópica, oral o sistémica y/o inyectada. Por ejemplo, un polipéptido o polipéptidos de u-PA modificados o composición farmacéutica que contienen un polipéptido de u-PA modificado se pueden administrar tópicamente, tal como en forma de gotas para los ojos. En otro ejemplo, un polipéptido de u-PA modificado o composición farmacéutica que contiene un polipéptido de u-PA modificado se puede administrar mediante administración periocular y/o intravítrea o intrarretiniana o subretiniana, tal como, por ejemplo, mediante inyección periocular, o intrarretiniana, o intravítrea.

Los polipéptidos de u-PA modificados o composición farmacéutica que contienen polipéptidos de u-PA modificados o ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos de u-PA modificados se pueden formular para administración sistémica para el tratamiento de DGF. En otro ejemplo, los polipéptidos de u-PA modificados o composición farmacéutica que

contienen polipéptidos de u-PA modificados o ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de u-PA modificados se infunden o inyectan directamente en el riñón o en los tejidos u órganos adyacentes o que rodean el riñón trasplantado. Los polipéptidos de u-PA modificados o composición farmacéutica que contienen polipéptidos de u-PA modificados se pueden administrar antes del momento del trasplante de aloinjerto o en el momento del trasplante con administración continuada de manera crónica, y/o se pueden administrar durante un episodio de rechazo en el caso de que ocurra este episodio.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para aplicación local o tópica, tal como para aplicación tópica en la piel (transdérmica) y membranas mucosas, tal como en el ojo, en forma de geles, cremas y lociones y para aplicación en el ojo o para aplicación intracisternal o intraespinal. Las soluciones, particularmente aquellas destinadas para uso oftálmico, se pueden formular como soluciones isotónicas al 0.01% - 10% y pH aproximadamente 5-7 con sales apropiadas. Los compuestos se pueden formular como aerosoles para aplicación tópica, tal como por inhalación (ver, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Núms.º 4,044,126, 4,414,209 y 4,364,923, que describen aerosoles para la administración de un esteroide útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, particularmente asma).

La concentración de compuesto activo en la composición de fármaco depende de las velocidades de absorción, inactivación y excreción del compuesto activo, el cronograma de dosis y la cantidad administrada, así como otros factores conocidos por aquellos expertos en la técnica. Como se describe adicionalmente en la presente, las dosificaciones se pueden determinar empíricamente usando comparaciones de propiedades y actividades (*por ejemplo,* escisión de una o más proteínas de complemento) del polipéptido de u-PA modificado en comparación con el polipéptido de u-PA tipo silvestre y/o no modificado.

Las composiciones, si se desea, se pueden presentar en un envase, en un kit o dispositivo dispensador, que puede contener una o más formas de dosis unitaria que contienen el ingrediente activo. En algunos ejemplos, la composición se puede recubrir en un dispositivo, tal como, por ejemplo, en un tubo o filtro en, por ejemplo, una máquina de derivación. El envase, por ejemplo, contiene láminas de metal o plástico, tal como un blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para administración. Las composiciones que contienen los agentes activos pueden empaquetarse como artículos de fabricación que contienen material de empaque, un agente proporcionado en la presente y una etiqueta que indica el trastorno para el cual se proporciona el agente.

También se proporcionan composiciones que contienen moléculas de ácido nucleico, incluyendo vectores de expresión, que codifican para los polipéptidos de u-PA. En

algunas modalidades, las composiciones de moléculas de ácido nucleico que codifican para los polipéptidos de u-PA y vectores de expresión que codifican para ellos son adecuadas para terapia génica. En lugar de administrar la proteína, el ácido nucleico se puede administrar *in vivo*, tal como sistémicamente o por otra vía, o *ex vivo*, tal como mediante remoción de células, incluidos linfocitos, introducción del ácido nucleico en el mismo y reintroducción en el hospedador o un receptor compatible.

2. Administración de ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos de U-PA modificados (terapia génica)

Los polipéptidos de u-PA modificados se pueden administrar a células y tejidos mediante expresión de moléculas de ácido nucleico. Los polipéptidos de u-PA modificados se pueden administrar como moléculas de ácido nucleico que codifican para los polipéptidos de u-PA modificados, que incluyen técnicas *ex vivo* y expresión directa *in vivo*. Los ácidos nucleicos se pueden administrar a células y tejidos por cualquier método conocido por aquellos expertos en la técnica. El ácido nucleico aislado se puede incorporar en vectores para una manipulación adicional. Los métodos para administrar polipéptidos de u-PA mediante expresión de moléculas de ácido nucleico codificantes incluyen administración de vectores recombinantes. El vector se puede diseñar para permanecer episómico, tal como mediante la inclusión de un origen de replicación o se puede diseñar para integrarse en un cromosoma en la célula.

Los polipéptidos de u-PA también se pueden usar en terapia de expresión génica *ex vivo* usando vectores. Los vectores de terapia génica adecuados y métodos de administración se conocen por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, las células se pueden modificar para expresar un polipéptido de u-PA modificado, tal como mediante la integración de polipéptido de u-PA que codifica ácido nucleico en una ubicación genómica, ya sea unido operativamente a secuencias reguladoras o tal que se coloca unido operativamente a secuencias reguladoras en una ubicación genómica. Las células después se pueden administrar de manera local o sistémica a un sujeto, tal como un paciente en necesidad de tratamiento. Los vectores de ejemplo para terapia génica *in vivo* y *ex vivo* incluyen vectores virales y vectores no virales tal como, por ejemplo, liposomas o cromosomas artificiales.

Se pueden emplear vectores virales que incluyen, por ejemplo, adenovirus, virus del herpes, virus adenoasociados (AAV), retrovirus, tal como lentivirus, EBV, SV40, vectores de citomegalovirus, vectores del virus vaccinia y otros diseñados para terapia génica. Los vectores pueden ser aquellos que permanecen episómicos o aquellos que se pueden integrar en los cromosomas del sujeto tratado. Un polipéptido de u-PA modificado se puede codificar en un vector viral, tal como AAV, que se administra a un sujeto en necesidad de tratamiento.

Los vectores de virus adecuados para terapia génica incluyen adenovirus, virus adeno-asociado, retrovirus, lentivirus, y otros mencionados anteriormente. Por ejemplo, la tecnología de expresión de adenovirus es bien conocida en la técnica y los métodos de producción y administración de adenovirus también son bien conocidos. Los serotipos de adenovirus están disponibles, por ejemplo, a partir de la American Type Culture Collection (ATCC®, Rockville, MD). El adenovirus se puede usar *ex vivo*, por ejemplo, las células se aíslan de un paciente en necesidad de tratamiento y se transducen con un vector de adenovirus que expresa polipéptido de u-PA modificado. Después de un período de cultivo adecuado, las células transducidas se administran a un sujeto, local y/o sistémicamente. De manera alternativa, las partículas de adenovirus que expresan polipéptido de u-PA se aíslan y formulan en un portador farmacéuticamente aceptable para la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva para prevenir, tratar o mejorar una enfermedad o condición de un sujeto. En una modalidad, la enfermedad que se va a tratar es causada por activación del complemento. Habitualmente, las partículas de adenovirus se administran a una dosis que varía de 1 partícula a 10^{14} partículas por kilogramo de peso del sujeto, en general entre 10^{6} o 10^{8} partículas a 10^{12} partículas por kilogramo de peso del sujeto.

Las moléculas de ácido nucleico se pueden introducir en cromosomas artificiales y otros vectores no virales. Cromosomas artificiales, tales como *ACES* (ver, Lindenbaum *et al. Nucleic Acids Res*. (2004) 32(21):e172) se puede modificar para codificar y expresar el polipéptido de u-PA. En resumen, los cromosomas artificiales de mamíferos (MAC) proporcionan un medio para introducir grandes cargas útiles de información genética en la célula en un formato de replicación autónoma no integrador. Único entre las MAC, el Sistema de Expresión de Cromosomas Artificiales (*ACES*) basado en ADN satelital de mamífero se puede generar *de novo* de forma reproducible en líneas celulares de diferentes especies y se puede purificar fácilmente de los cromosomas de las células hospedadoras. Los ACE de mamíferos purificados se pueden reintroducir en una variedad de líneas celulares receptoras donde se han mantenido de manera estable durante períodos prolongados en la ausencia de presión selectiva usando un sistema AS. Usando este enfoque, se ha logrado la carga específica de una o dos dianas génicas en células LMTK(-) y CHO.

Otro método para introducir ácidos nucleicos que codifican para los polipéptidos de u-PA modificados es una técnica de reemplazo génico de dos pasos en levadura, comenzando con un genoma de adenovirus completo (Ad2; Ketner *et al*. (1994) *Proc. Natl. Acad.* Sci. EUA 91: 6186-6190) clonado en un cromosoma artificial de levadura (YAC) y un plásmido que contiene secuencias de adenovirus para dirigirse a una región específica en el clon de YAC, un casete de expresión para el gen de interés y un marcador seleccionable

positivo y negativo. Los YAC son de particular interés porque permiten la incorporación de genes más grandes. Este enfoque se puede usar para la construcción de vectores basados en adenovirus que contienen ácidos nucleicos que codifican para cualquiera de los polipéptidos de u-PA modificados descritos para la transferencia génica a células de mamíferos o animales enteros.

Los ácidos nucleicos se pueden encapsular en un vehículo, tal como un liposoma, o introducirse en una célula, tal como una célula bacteriana, particularmente una bacteria atenuada o introducirse en un vector viral. Por ejemplo, cuando se emplean liposomas, las proteínas que se unen a una proteína de membrana de superficie celular asociada con endocitosis se pueden usar para dirigirse y/o facilitar la absorción, *por ejemplo,* proteínas de cápside o fragmentos de estas trópicas para un tipo de célula particular, anticuerpos para proteínas que se someten a internalización en ciclos y proteínas que se dirigen a la localización intracelular y mejoran la semivida intracelular.

En algunas modalidades, es deseable proporcionar una fuente de ácido nucleico con un agente que se dirige a células, tal como un anticuerpo específico para una proteína de membrana de superficie celular o una célula diana, o un ligando para un receptor en una célula diana. Los polinucleótidos y vectores de expresión proporcionados en la presente se pueden realizar por cualquier método adecuado. Además se proporcionan vectores de ácido nucleico que contienen moléculas de ácido nucleico como se describe anteriormente. Además, se proporcionan vectores de ácido nucleico que contienen moléculas de ácido nucleico como se describió anteriormente y células que contienen estos vectores.

Para métodos *ex vivo* e *in vivo*, se introducen moléculas de ácido nucleico que codifican para el polipéptido de u-PA en células que son de un donante adecuado o del sujeto que se va a tratar. Las células en las que se puede introducir un ácido nucleico para fines de terapia incluyen, por ejemplo, cualquier tipo de célula disponible deseada apropiada para la enfermedad o condición que se va a tratar, que incluye, pero no se limita a, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas tal como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; varias células madre o progenitoras, que incluyen células madre o progenitoras hematopoyéticas, *por ejemplo,* tal como células madre obtenidas de médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal y otras fuentes de las mismas.

Para el tratamiento *ex vivo*, se retiran células de un donante compatibles con el sujeto a tratar o células de un sujeto a tratar, se introduce el ácido nucleico en estas células aisladas y se administran las células modificadas al sujeto. El tratamiento incluye

administración directa, tal como, por ejemplo, encapsulada dentro de membranas porosas, que se implantan en el paciente (ver, *por ejemplo,* Patentes de Estados Unidos Núms. 4.892.538 y 5.283.187). Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico a células de mamíferos *in vitro* incluyen el uso de liposomas y lípidos catiónicos (*por* ejemplo, DOTMA, DOPAJE y DC-Chol), electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano y métodos de precipitación de fosfato de calcio. Se pueden usar métodos de administración de ADN para expresar polipéptidos de U-PA *in vivo*. Los métodos incluyen administración de liposomas de ácidos nucleicos y administración de ADN desnudo, que incluye administración local y sistémica tal como usar electroporación, ultrasonido y administración de fosfato de calcio. Otras técnicas incluyen microinyección, fusión celular, transferencia de genes mediada por cromosomas, transferencia de genes mediada por microcélulas y fusión de esferoplastia.

La expresión *in vivo* de un polipéptido de u-PA modificado se puede enlazar a la expresión de moléculas adicionales. Por ejemplo, la expresión de un polipéptido de u-PA se puede enlazar con la expresión de un producto citotóxico tal como en un virus modificado o se expresa en un virus citotóxico. Estos virus se pueden dirigir a un tipo de célula particular que es una diana para un efecto terapéutico. El polipéptido de u-PA expresado se puede usar para mejorar la citotoxicidad del virus.

La expresión *in vivo* de un polipéptido de u-PA puede incluir enlazar operativamente un polipéptido de u-PA que codifica para una molécula de ácido nucleico a secuencias reguladoras específicas tal como un promotor específico de células o tejido. Los polipéptidos de u-PA también se pueden expresar a partir de vectores que infectan y/o replican específicamente en tipos de células y/o tejidos diana. Los promotores inducibles se pueden usar para regular selectivamente la expresión de polipéptido de u-PA.

Las moléculas de ácido nucleico, como ácidos nucleicos desnudos o en vectores, se pueden administrar al sujeto cromosomas artificiales, liposomas y otros vehículos mediante administración sistémica, tópica, local y otras vías de administración. Cuando es sistémica e *in vivo*, la molécula de ácido nucleico o vehículo que contiene la molécula de ácido nucleico se puede dirigir a una célula.

La administración también puede ser directa, tal como mediante la administración de un vector o células que habitualmente se dirigen a una célula o tejido. Por ejemplo, las células tumorales y las células proliferativas se pueden dirigir a células para expresión *in vivo* de polipéptidos de u-PA. Las células utilizadas para la expresión *in vivo* de un polipéptido de u-PA también incluyen células autólogas al paciente. Estas células se pueden retirar de un paciente, se pueden introducir ácidos nucleicos para la expresión de un polipéptido de u-PA

y después administrarse a un paciente tal como mediante inyección o injerto.

Administración para el tratamiento de AMD y otras enfermedades oculares

Los ácidos nucleicos que codifican para los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados se pueden administrar para el tratamiento de enfermedades o condiciones que implican la activación del complemento en su etiología, en la cual la inhibición de los mismos puede mejorar un síntoma de la enfermedad o condición o de otro modo tratar la enfermedad o condición. Los ácidos nucleicos, tal como vectores, tal como vectores virales, diseñados para la administración de ácidos nucleicos que codifican para los polipéptidos de u-PA modificados descritos en la presente se pueden administrar a sujetos por cualquier vía adecuada o una combinación de diferentes vías, dependiendo de la enfermedad o condición. La administración de ácido nucleico se puede efectuar mediante administración directa al ojo (tal como mediante administración ocular, inyección subretiniana, inyección intravítrea (IVT), inyección intrarretiniana o administración tópica (por ejemplo, gotas oftálmicas)) o administración a través de vías sistémicas, por ejemplo, intraarterial, intraocular, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica y otras vías de administración parentales.

Un experto en la técnica puede seleccionar cualquier modo de administración compatible con el sujeto y el virus para su administración, y también es probable que el virus alcance e ingrese al tipo de célula o tejido diana, *por* ejemplo, ojo, tal como células epiteliales de pigmento retiniano (RPE) y/o células fotorreceptoras. La vía de administración se puede seleccionar por un experto en la técnica de acuerdo con cualquiera de una variedad de factores, incluyendo la naturaleza de la enfermedad, las propiedades de la célula o tejido diana (por ejemplo, tipo de célula) y el virus particular que se administrará. La administración se puede seleccionar donde se dirigen células o tejido de interés, tal como el ojo, *por* ejemplo, las células epiteliales del pigmento retiniano (RPE) y/o células fotorreceptoras o el espacio subretiniano.

El ácido nucleico que codifica para los polipéptidos de u-PA modificados, tal como vectores de expresión viral, se puede administrar, por ejemplo, a la célula diana que se caracteriza por la enfermedad, tal como una enfermedad ocular, tal como AMD. Por ejemplo, la composición que contiene el virus se puede administrar mediante inyección subretiniana, tal como inyección subretiniana al epitelio pigmentario de la retina (RPE), células fotorreceptoras u otras células oculares (por ejemplo, células ganglionares de la retina). En algunos ejemplos, la administración subretiniana de un virus, tal como cualquier virus que contiene los ácidos nucleicos descritos en la presente, requiere que el médico experto realice una vitrectomía (es decir, donde se crea un orificio de aguja en la retina (retinomía) y se inyecta fluido, tal como fluido que contiene un virus, tal como cualquier virus descrito en la presente).

Las inyecciones subregionales se pueden efectuar a través de una vía transcorneal, a través de la pupila y luego pasar a través del cristalino, el vítreo y la retina. En otros ejemplos, la inyección subretiniana se puede realizar haciendo pasar una aguja o cualquier otro dispositivo de administración a través de la esclerótica, ingresando al área pars plana o limbo, a través del vítreo medio o posterior y al lado opuesto de la retina, en el espacio subretiniano. En otros ejemplos, la inyección subretiniana se puede realizar haciendo pasar una aguja o cualquier otro dispositivo de administración a través de la esclerótica y a través de la coroides y la membrana de Bruch, evitando que la retina logre la administración al RPE. Otras vías apropiadas para la administración subretiniana se pueden determinar por el experto en la técnica o médico o cirujano. En algunos ejemplos, la formación de ampollas señala una administración exitosa.

En otros ejemplos, la composición que contiene ácido nucleico que codifica para el polipéptido de u-PA modificado para expresión en el ojo se puede administrar mediante inyección intravítrea a células oculares, tal como administración para dirigirse a células y células vítreas en la retina interna. En algunos ejemplos, la inyección intravítrea se realiza haciendo pasar una aguja o cualquier otro dispositivo de administración a través de la porción pars plana, a través del vítreo medio o posterior y hacia el lado opuesto de la retina. Después de la inyección intravítrea, la composición que contiene el virus se puede administrar para infectar células ganglionares. En otros ejemplos, la composición que contiene el virus administrado por inyección intravítrea se dirige a células de capa nuclear interna. La eficacia de la administración depende del título del virus y del serotipo. En algunos ejemplos, el tratamiento comprende inyección intravítrea directa combinada con un dispositivo implantable intravítreo (es decir, dispositivos implantables intravítreos bioerosionables y no bioerosionables) para aumentar la concentración del agente administrado en la parte posterior del ojo (Hwang et al. (2012) J Korean Med Sci 27:1580-85).

En otros ejemplos, la composición que contiene el ácido nucleico que codifica para el polipéptido de u-PA modificado se inyecta mediante la vena palpebral para dirigirse a células oculares. En otros ejemplos, el virus se aplica ex vivo (por ejemplo, se aplica a células de retina fetal o coroides de RPE extirpadas) para trasplante en el ojo, tal como, por ejemplo, como un injerto de retina. En otros ejemplos, un experto en la técnica, tal como el médico experto puede seleccionar la vía adecuada para la administración de cualquier virus que contiene los ácidos nucleicos descritos en la presente. Si se desea, se pueden combinar las vías de administración.

En un ejemplo, el virus se administra localmente, en el sitio donde las células diana, por ejemplo, células enfermas, están presentes, es decir, en el ojo o la retina. La

administración tópica a menudo se usa en enfermedades oculares del segmento anterior del ojo (Patel et al. World J Pharmacol (2013) 2:47-64).

En un ejemplo, un virus que se administrará por vía intravítrea se puede administrar con una aguja delgada (27 a 30 G) a través de la pars plana dentro del cuerpo vítreo. El experto en la técnica determinará hasta dónde se inserta el eje de la aguja en el ojo (por ejemplo, profundidad de inserción), la velocidad de administración (por ejemplo, la presión aplicada al émbolo), el ángulo de orientación del bisel y el ángulo entre el eje y la pars plana.

H. USOS TERAPÉUTICOS Y MÉTODOS DE TRATAMIENTO

Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente se dirigen a la proteína C3 de complemento y permiten la modulación de enfermedades y trastornos mediados por complemento. Las proteasas terapéuticas, tal como los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente, tienen muchas ventajas potenciales sobre los enfoques terapéuticos tradicionales. El principal de ellos es la capacidad de inactivar las dianas de la enfermedad de manera catalítica (*es* decir, una estequiometría de uno a muchos). Por lo tanto, las proteasas pueden mantener regulación eficaz a concentraciones significativamente por debajo de la concentración diana. Las ventajas diferenciadoras adicionales incluyen (1) inactivación irreversible; (2) dosis baja; (3) frecuencia de dosis disminuida (4) tamaño molecular pequeño; (5) capacidad para dirigirse a modificaciones postraduccionales; (6) capacidad para neutralizar altas concentraciones diana; y (7) capacidad para dirigirse *lejos* del sitio activo. Como agente terapéutico, una proteasa aún debe exhibir las siguientes características: (1) acceso a la diana molecular (extracelular) y (2) poseen especificidad suficientemente estricta para una diana crítica para un estado de enfermedad. Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente se pueden usar en el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por complemento.

El experto en la técnica entiende el papel del sistema de complemento en los procesos de enfermedad y es consciente de una variedad de estas enfermedades. Se proporciona un breve análisis de enfermedades de ejemplo y el papel de la proteína C3 de complemento en su etiología y patología. Los polipéptidos de u-PA modificados y moléculas de ácido nucleico proporcionadas en la presente se pueden usar para el tratamiento de cualquier condición para la cual está implicada la activación de la vía de complemento, particularmente condiciones inflamatorias que incluyen condiciones inflamatorias agudas, tal como shock séptico, y condiciones inflamatorias crónicas, tal como artritis reumatoide (RA). Las condiciones agudas e inflamatorias se pueden manifestar como una enfermedad mediada por el sistema inmunitario tal como, por ejemplo, enfermedad autoinmunitaria o lesión de tejido causada por inflamación mediada por complejo inmunitario. Una condición inflamatoria

mediada por complemento también se puede manifestar como una enfermedad neurodegenerativa o cardiovascular que tiene componentes inflamatorios. Esta sección proporciona usos y métodos de administración de ejemplo para polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente. Estas terapias descritas son ejemplos y no limitan las aplicaciones de los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, métodos de tratamiento de condiciones fisiológicas y médicas descritas y enumeradas a continuación. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, métodos de tratamiento de degeneración macular relacionada con la edad (AMD), atrofia geográfica (GA), hemoglobinuria nocturna paroxística (PNH), función de injerto retardada renal (DGF), sepsis, artritis reumatoide (RA), glomerulonefritis membranoproliferativa (MPGN), lupus eritematoso, esclerosis múltiple (MS), miastenia grave (MG), asma, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome de dificultad respiratoria, lesión inflamatoria aguda mediada por complejo inmunitario (IC), insuficiencia multiorgánica, enfermedad de Alzheimer (AD), lesiones por isquemia-perfusión causadas por eventos o tratamientos tal como infarto de miocardio (MI), accidente cerebrovascular, derivación cardiopulmonar (CPB) o injerto de derivación de arteria coronaria, angioplastia o hemodiálisis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), fibrosis pulmonar idiopática (IPF) y/o síndrome de Guillain Barre.

El tratamiento de enfermedades y condiciones con polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente se puede efectuar por cualquier vía de administración adecuada usando formulaciones adecuadas como se describe en la presente incluyendo, pero no limitado a, inyección subcutánea, administración oral, intravítrea, intrarretiniana, subretiniana, periocular y transdérmica. Si es necesario, se puede determinar empíricamente o extrapolar una dosis y duración particulares y un protocolo de tratamiento. Por ejemplo, las dosis de ejemplo de polipéptidos de u-PA tipo silvestre se pueden usar como un punto de partida para determinar dosificaciones adecuadas. Los polipéptidos de u-PA modificados que tienen más especificidad y/o selectividad en comparación con un polipéptido de u-PA tipo silvestre pueden ser eficaces a cantidades y/o frecuencias de dosis reducidas. Los niveles de dosis se pueden determinar con base en una variedad de factores, tal como peso corporal del individuo, salud general, edad, actividad del compuesto específico empleado, género, dieta, momento de administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos, gravedad y curso de la enfermedad, y disposición del paciente a la enfermedad y juicio del médico tratante. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con los materiales portadores para producir una forma de dosis individual variará dependiendo del hospedador tratado y del modo particular de administración.

Tras la mejora de la condición de un paciente, se puede administrar una dosis de

mantenimiento de un compuesto o composiciones, si es necesario; y se puede modificar la dosis, la forma de dosis o frecuencia de administración, o una combinación de las mismas. En algunos casos, un sujeto puede requerir tratamiento intermitente a largo plazo sobre cualquier recurrencia de síntomas de enfermedad.

1. Enfermedad mediada por la activación del complemento

La cascada de complemento es una espada de doble filo, causando protección contra invasión bacteriana y viral al promover fagocitosis e inflamación. Por el contrario, incluso cuando el complemento está funcionando normalmente, puede contribuir al desarrollo de la enfermedad al promover la inflamación local y el daño a los tejidos. Por lo tanto, los efectos patológicos son mediados por los mismos mediadores que son responsables de los roles protectores de complemento. Por ejemplo, el péptido anafiláctico y quimiotáctico C5a impulsa la inflamación al reclutar y activar neutrófilos, C3a puede causar la activación patológica de otros fagocitos y el complejo de ataque de membrana puede destruir o dañar células. En un ejemplo, tal como en muchas enfermedades autoinmunes, el complemento produce daño en el tejido porque se activa en circunstancias inapropiadas, tal como mediante anticuerpo para alojar tejidos. En otras situaciones, el complemento se puede activar normalmente, tal como por septicemia, pero aún contribuye a la progresión de la enfermedad, tal como en el síndrome de dificultad respiratoria. Patológicamente, el complemento puede causar daños sustanciales a los vasos sanguíneos (vasculitis), la membrana basal renal y las células endoteliales y epiteliales unidas (nefritis), el sinovio articular (artritis) y los eritrocitos (hemólisis) si no se controla adecuadamente.

El complemento tiene un papel en la inmunopatogénesis de un número de trastornos, incluyendo enfermedades autoinmunes tal como artritis reumatoide (ver, *por* ejemplo, Wang *et al*. (1995) *Proc. Natl. Acad.* Sci. E.U.A. 92:8955-8959; Moxley *et al.* (1987) *Arthritis & Rheumatism* 30:1097-1104), lupus eritematoso (Wang *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad.* Sci. E.U.A. 90:8563-8568; y Buyon *et al.* (1992) *Arthritis Rheum.* 35:1028-1037) y glomerulonefritis aguda (Couser *et al.* (1995) *J Am Soc Nephrol.* 5:1888-1894). Otras patologías que implican la activación del sistema de complemento incluyen sepsis (ver, *por* ejemplo, Stove *et al.* (1996) *Clin Diag Lab Immunol* 3:175-183; Hack *et al.* (1989) *Am. J. Med*. 86:20-26), síndrome de dificultad respiratoria (ver, *por* ejemplo, Zilow *et al.* (1990) *Clin. Exp. Immunol*. 79:151-157; y Stevens *et al.* (1986) *J. Clin. Invest.* 77:1812-1816), falla multiorgánica (ver, *por* ejemplo, Hecke *et al.* (1997) *Shock* 7:74; y Heideman *et al.* (1984) *J. Trauma* 24:1038-1043), lesión por isquemia-reperfusión tal como ocurre en enfermedad cardiovascular tal como accidente cerebrovascular o infarto de miocardio (Austen WG *et al*. (2003) *Int J Immunopathol Pharm* 16(1):1-8), degeneración macular relacionada con la edad (Bradley *et*

al. Eye 25: 683-693 (2011); Gemenetzi *et al. Eye* 30: 1-14 (2016)) y función renal retardada de injerto (Danobeitia *et al.* [abstract]. *Am J Transplant*. 2013; 13 (suppl 5); Yu *et al.* (2016) *Am J Transplant* 16(9):2589-2597; Castallano *et al.* (2010) *Am J Pathol* 176(4):1648-1659). Posteriormente se describen algunos ejemplos de enfermedades mediadas por complemento de ejemplo.

a. Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad inflamatoria crónica. Es una enfermedad autoinmune en la que el sistema inmunitario ataca los componentes del tejido normal como si fueran patógenos invasores. La inflamación asociada con artritis reumatoide ataca principalmente los revestimientos de las articulaciones. Las membranas que recubren los vasos sanguíneos, el corazón y los pulmones también pueden inflamarse. La RA se caracteriza por células B activadas y células plasmáticas que están presentes en sinovio inflamado y en folículos linfoides y centros germinales de enfermedad establecidos. Esto da como resultado altos niveles de producción de inmunoglobulinas locales y la deposición de complejos inmunitarios, que pueden incluir factores reumatoides IgG e IgM, en el sinovio y en asociación con cartílago articular que puede servir como iniciadores de la cascada de complemento. Se han encontrado niveles elevados de componentes de complemento, tal como C3a, C5a y C5b-9 dentro de las articulaciones reumatoides inflamadas. Estos componentes de complemento pueden exacerbar la inflamación asociada con RA al inducir una variedad de actividades proinflamatorias tal como, por ejemplo, alteraciones en la permeabilidad vascular, quimiotaxis de leucocitos y la activación y lisis de múltiples tipos celulares.

b. Sepsis

La sepsis es una enfermedad causada por una infección grave, como una infección bacteriana, que conduce a una respuesta inflamatoria sistémica. El componente de la pared celular bacteriana, lipopolisacárido, a menudo se asocia con sepsis, aunque otras infecciones bacterianas, virales y fúngicas pueden estimular los síntomas sépticos. El shock séptico a menudo resulta si el sistema inmunitario natural del cuerpo es incapaz de defenderse contra un microorganismo invasor de tal manera que, por ejemplo, las consecuencias proinflamatorias de la respuesta inmunitaria son perjudiciales para los tejidos hospedadores. Las etapas tempranas de sepsis se caracterizan por una activación excesiva de complemento que resulta en una mayor producción de anafilatoxinas de complemento, tal como C3a, C4a y C5a que actúan para aumentar la permeabilidad vascular, estimular la producción de superóxido a partir de neutrófilos y estimular la liberación de histamina. Las acciones de C5a pueden contribuir a una respuesta inmunitaria productiva a una infección bacteriana, pero si

se dejan sin regular, C5a también puede ser severamente perjudicial. En un modelo de inflamación inducido por *E.coli*, el bloqueo de C5a mejoró el resultado de los animales sépticos al limitar la activación de neutrófilos mediada por C5a que puede conducir a lesión de tejido mediada por neutrófilos.

El deterioro continuo de la respuesta inmunitaria innata a una infección bacteriana a menudo conduce a sepsis crónica o shock séptico, que puede ser potencialmente mortal. En la etapa tardía de la sepsis, es la actividad "latente" de los neutrófilos, a diferencia de la hiperactividad que se produce en las fases tempranas, lo que contribuye a la enfermedad continua. En la etapa tardía, se reducen las principales funciones de los neutrófilos, incluida la quimiotaxis, la actividad del estallido respiratorias y la capacidad de aniquilar bacterias. El complemento, y en particular C5a, también juega un papel en las etapas posteriores de la sepsis. La producción excesiva de C5a durante la sepsis se asocia con la "desactivación" de neutrófilos en sangre, un proceso que se ha relacionado con la regulación por disminución inducida por C5a de su propio receptor, C5aR, en neutrófilos (Guo *et al*. (2003) *FASEB J* 13:1889). Los niveles reducidos de C5aR en neutrófilos se correlacionan con una capacidad disminuida de neutrófilos en sangre para unirse a C5a, respuestas quimiotácticas deterioradas, una pérdida de producciones de superóxido y actividad bactericida deteriorada. Los niveles de C5aR, sin embargo, pueden comenzar a "recuperarse" en etapas posteriores de sepsis y correlacionarse con casos de resultado beneficioso de la enfermedad.

c. Esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (MS) y su modelo animal de encefalomielitis alérgica experimental (EAE) son enfermedades desmielinizantes inflamatorias del sistema nervioso central (CNS). En la MS, la inflamación del tejido nervioso causa la pérdida de mielina, un material graso que actúa como una especie de aislamiento protector para las fibras nerviosas en el cerebro y la médula espinal. Esta desmielinización deja múltiples áreas de tejido cicatricial (esclerosis) a lo largo del recubrimiento de las células nerviosas, lo que interrumpe la capacidad de los nervios para conducir impulsos eléctricos hacia y desde el cerebro, produciendo los diversos síntomas de MS. La MS está mediada por linfocitos activados, macrófagos/microglías y el sistema de complemento. La activación del complemento puede contribuir a la patogénesis de estas enfermedades a través de su doble función: la capacidad del complejo terminal activado C5b-9 para promover la desmielinización y la capacidad del C5b-9 sublítico para proteger a los oligodendrocitos (OLG) de la apoptosis.

d. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (AD) se caracteriza por enredos (filamentos helicoidales emparejados anormales de la proteína tau, que normalmente se une a

microtúbulos) y placas (depósitos extracelulares compuestos principalmente de proteína beta-amiloide) dentro del cerebro. Aunque la causa precisa de la AD no está del todo clara, la neuroinflamación crónica en regiones afectadas del cerebro de la AD sugiere que los mediadores proinflamatorios pueden jugar un papel. Los enredos y placas dentro de un cerebro de AD se depositan con fragmentos de complemento activados, tal como, por ejemplo, C4d y C3d. Asimismo, las neuritas distróficas en un cerebro de AD se pueden inmunoteñir para MAC, lo que indica un ataque autocatalítico de estas neuritas y la pérdida concomitante de neuritas en AD. La activación del complemento en AD se produce por un mecanismo independiente de anticuerpos inducido por la proteína beta-amiloide agregada. Además, la cascada de complemento se puede activar por las pentraxinas, proteína C reactiva (CRP) y amiloide P (AP) que están reguladas por aumento en AD (McGeer *et al*., (2002) *Trends Mol Med* 8:519). La activación del complemento en AD, marcada por aumentos en mediadores de complemento, no se controla adecuadamente mediante una regulación por aumento compensatoria de proteínas reguladoras de complemento tal como, por ejemplo, CD59. Por lo tanto, las consecuencias proinflamatorias de la activación del complemento exacerban la progresión de la AD y probablemente contribuyen a la destrucción de neuritas.

e. Lesión por isquemia-retrafusión

La lesión por isquemia-perfusión es la lesión sufrida después de un evento isquémico y posterior restauración del flujo sanguíneo y resulta de la respuesta inflamatoria a un insulto hipóxico. El daño por isquemia-perfusión puede ser agudo como durante procedimientos de cirugía cardíaca, tal como, por ejemplo, después de cirugía o angioplastia a corazón abierto, o crónico como con insuficiencia cardíaca congestiva o enfermedad cardiovascular oclusiva. Ejemplos de lesiones que pueden causar lesión por isquemia-reperfusión incluyen infarto de miocardio (MI) y accidente cerebrovascular. El inicio de una respuesta inflamatoria es probablemente causado por el aumento en los niveles de oxígeno de tejido que se producen con la reperfusión y la acumulación concomitante de metabolitos que pueden generar radicales libres de oxígeno que son inmunoestimulantes. La lesión por isquemia-perfusión se asocia con una variedad de eventos que incluyen gravedad del infarto de miocardio, eventos isquémicos cerebrales, isquemia intestinal y muchos aspectos de la cirugía vascular, cirugía cardíaca, trauma y trasplante. La lesión se manifiesta por eventos inflamatorios del sistema inmunitario innato, particularmente la activación del sistema de complemento, en respuesta a tejido recién alterado como no propio. Como tal, la lesión por isquemia-reperfusión se caracteriza por edema de tejido causado por una mayor permeabilidad vascular y un infiltrado celular inflamatorio agudo causado por la afluencia de leucocitos polimorfonucleares.

La activación del sistema de complemento juega un papel en los eventos inflamatorios de la lesión por isquemia-reperfusión. La lesión por isquemia resulta en alteraciones de la membrana celular, afectando lípidos, carbohidratos o proteínas de la superficie externa de modo que estos epítopos expuestos se alteran y pueden actuar como neoantígenos (autoantígenos modificados). La IgM circulante reconoce y se une a los neoantígenos para formar complejos inmunitarios en la superficie celular lesionada. Los complejos antígeno-anticuerpo formados son activadores clásicos de la vía clásica de complemento, aunque es probable que todas las vías estén involucradas de alguna manera en los efectos exacerbantes de la lesión. La implicación de la vía clásica de complemento para la lesión por isquemia-reperfusión se evidencia por ratones genéticamente deficientes en C3 o C4 que muestran igual protección contra lesiones locales en un modelo de lesión de extremidad trasera y animal (Austen *et al*. (2003) *Int J Immunopath Pharm* 16:1). Por el contrario, en un modelo renal de lesión por isquemia, los ratones con deficiencia de C3, C5 y C6 estaban protegidos, mientras que los ratones con deficiencia de C4 no lo estaban, lo que sugiere la importancia de la vía alternativa de complemento (Guo *et al*. (2005) *Ann Rev Immunol* 23:821). Los mediadores inducidos después de la activación del complemento inician una respuesta inflamatoria dirigida a la membrana celular en el sitio de lesión local.

Un mecanismo efector principal de complemento en lesión por isquemia-reperfusión es la afluencia y activación de neutrófilos al tejido inflamado por componentes de complemento, tal como, por ejemplo, C5a. La activación de neutrófilos resulta en una mayor producción de especies reactivas de oxígeno y la liberación de enzimas lisosomales en órganos lesionados locales que en última instancia resulta en apoptosis, necrosis y una pérdida o función orgánica. La generación del MAC terminal, C5b-9, también contribuye a la lesión de tejido local en la lesión por isquemia-reperfusión.

f. Trastornos oculares

En el ojo normal, el sistema de complemento se activa continuamente a niveles bajos; las proteínas reguladoras de complemento intraocular solubles unidas a membrana regulan estrechamente esta activación del complemento espontánea. La activación del complemento de bajo nivel protege contra patógenos sin causar ningún daño al autotejido y pérdida de visión. El sistema de complemento y las proteínas reguladoras de complemento controlan la inflamación intraocular en la uveítis autoinmunitaria y desempeñan un papel importante en el desarrollo de inflamación corneal, degeneración macular relacionada con la edad y retinopatía diabética. El sistema de complemento juega un papel importante en la patogénesis de la retinopatía diabética (ver, *por* ejemplo, Ghosh *et al*. (2015) *Endocr Rev* 36:272–288) así como neuropatía diabética y enfermedad cardiovascular diabética. La

activación espontánea de complemento puede causar daño al tejido corneal después de la infección. La inhibición de complemento es un objetivo terapéutico relevante en el tratamiento de diversas enfermedades oculares (ver, *por* ejemplo, Purushottam *et al.* (2007) *Mol Immunol.* 44:3901-3908).

Degeneración Macular Relacionada con la Edad (AMD)

La degeneración macular relacionada con la edad es un término clínico que describe una variedad de enfermedades que se caracterizan por la pérdida progresiva de la visión central. La AMD es la principal causa de pérdida de visión en personas de edad avanzada en muchos países industrializados (Jager *et al*. (2008) *N Engl J Med* 358:2606-2617) .La pérdida de visión ocurre debido a la degeneración progresiva de la mácula, la región en la parte posterior del ojo comprende una alta densidad de fotorreceptores de cono, que está especializada en alta agudeza, visión central.

La AMD puede manifestarse como AMD seca (no neovascular) y/o AMD húmeda. La AMD seca es la forma más común (85-90% de los casos) y más leve de AMD, y se caracteriza por lesiones pequeñas, redondas, blanco-amarillas (drusas) dentro y debajo de la mácula. La AMD seca avanzada, o atrofia geográfica, conduce al adelgazamiento de la retina debido a la pérdida de fotoreceptores PRE, deterioro de la mácula y eventual ceguera. Aunque es más raro, la pérdida de visión asociada con la AMD húmeda en general es más dramática que en la AMD seca. La AMD húmeda incluye la formación de vasos sanguíneos patógenos, denominada neovascularización coroidea (CNV), en la que se desarrollan vasos sanguíneos anormales debajo de la capa del epitelio pigmentario de la retina (RPE). La invasión de CNV de la retina desde la coroides subyacente a través de fracturas en la membrana de Bruch, la matriz extracelular entre la coroides y el epitelio pigmentario de la retina (RPE), o su rotura puede causar pérdida de visión en AMD (*por ejemplo,* debido a hemorragia subretiniana y/o cicatrización).

Las características clínicas tempranas de la AMD incluyen engrosamiento de la membrana de Bruch y la aparición de drusas (Gass, J. D. (1972) *Trans. Soy Oftalmol. Soc.* 70: 409-36), que son depósitos lipoproteínicos extracelulares que consisten en proteínas agregadas (*es decir,* albúmina, apolipoproteína E (APOE)), componentes de la vía de complemento (*por ejemplo,* factor de complemento H (CFH), C1q, C3, C5, C5b, C6, C7, C8, C9 y vitronectina (Hageman *et al*., (2001) *Prog*. *Retin. Eye. Res* 29:95-112; Hageman *et al.* (2005) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 102: 7227-7232; Mullins *et al.* (2000) *FASEB H* 14:835-846; Anderson *et al.*, (2010) *Pro. Retin. Eye Res.* 29:95-112)), inmunoglobulinas y/o amiloide-β (Crabb *et al*., (2002) *Proc Natl Acad Sci* 99: 14682-14687; Johnson *et al.*, (2002) 99: 11830-11835)) y lípidos y componentes celulares que se localizan entre el RPE y la membrana Bruch.

La inflamación en la AMD está mediada por la desregulación de la vía alternativa de complemento. Los componentes de complemento C3 y C5 son constituyentes principales de drusas en pacientes con AMD (Mullins *et al*., (2000) *FASEB J* 14, 835-46; Johnson *et al*., (2000) *Exp Eye Res* 70, 441-9; Anderson *et al*., (2002) *Am J Ophthalmol* 134, 411-31; y *Leitner et al*., (2001) *Exp Eye Res* 73, 887-96). Se plantea la hipótesis de que la biogénesis de drusas implica procesos inflamatorios crónicos que pueden activar la activación y formación de complemento de MAC, lo que puede lisar las células RPE o alterar la homeostasis fisiológica en las células RPE, lo que conduce a la inflamación característica de la AMD (Johnson *et al*. (2001) *Exp Eye Res* 73, 887-896). También se detectaron proteínas de complemento (*por* ejemplo, C3d) en sangre en pacientes con AMD (Scholl *et al*., (2008) *PLoS One* 3: e2593), lo que indica que la inflamación inducida por AMD puede ser sistémica. Existe evidencia genética para un papel en el complemento en la patogénesis de AMD seca (Klein *et al. Science* 308(5720):385-389 (2005); Yates *et al.*, *NEJM* 357:553-561 (2007)), compstatina (y derivados de compstatina APL-1 y APL-2) y POT-4 (Potentia Pharmaceuticals), inhibidores de péptidos pequeños de C3, pueden ralentizar la progresión de la atrofia geográfica (Ricklin *et al*. (2008) *Adv. Exp. Med. Biol.* 632: 273-292) en AMD, lo que indica que C3 (*es decir,* inhibición de C3) puede ser un objetivo viable para el tratamiento de AMD.

g. Trasplante de órganos y función retardada del injerto (DGF)

El complemento juega un papel en la patogénesis de la lesión por isquemia-reperfusión. El mecanismo de la lesión por reperfusión renal depende de la generación de C5a y C5b-9, ambas de las cuales tienen toxicidad directa en los túbulos renales que contribuyen a la necrosis tubular aguda y apoptosis, y conducen a insuficiencia renal aguda post-isquémica y fibrosis de tejido. A su vez, la generación de estos componentes de la vía terminal depende de la síntesis intrarrenal de C3 y la disponibilidad de otros componentes de complemento que son esenciales para la activación del complemento. El nivel de expresión de C3 en el órgano donante depende en gran medida del tiempo isquémico frío (Elham *et al*. (2010) *Curr Opin Organ Transplant.* 15:486-491).

El rechazo en el trasplante de órganos sólidos está influenciado por la respuesta inflamatoria inicial y la posterior respuesta aloinmunitaria adaptativa, ambas de las cuales se ven afectadas por diversos componentes de complemento. Las proteínas de complemento desempeñan un papel significativo en el daño orgánico después del trasplante en el proceso de reperfusión isquémica y en la modulación de la activación de la respuesta inmunitaria adaptativa. Inhibir el complemento o modular la función de las moléculas de proteína de complemento puede reducir el daño al órgano de trasplante y aumentar la vida útil del órgano (ver, *por* ejemplo, Elham *et al*. (2010) *Curr Opin Organ Transplant.* 15:486-491). Dirigirse a los

componentes de complemento para la intervención terapéutica puede reducir el daño orgánico en el momento de la recuperación, transferencia y después del trasplante de órganos. Los órganos de ejemplo son los riñones. Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente se pueden administrar para mitigar y/o tratar daño orgánico luego de trasplante.

La función retardada de injerto (DGF), tal como la función retardada de injerto renal, es una condición que ocurre en un subconjunto de pacientes con trasplante de riñón en el cual el órgano trasplantado no funciona normalmente inmediatamente después del trasplante. Otros posibles trasplantes incluyen, pero no se limitan a, corazón, pulmón, tejido vascular, ojo, córnea, cristalino, piel, médula ósea, músculo, tejido conectivo, tejido gastrointestinal, tejido nervioso, hueso, células madre, islotes, cartílago, hepatocitos y células hematopoyéticas. El DGF renal se caracteriza por necrosis aguda del aloinjerto renal y se define clínicamente por la necesidad de diálisis poco después del trasplante. La lesión renal aguda durante el proceso de trasplante se manifiesta con frecuencia como DGF. La patología subyacente al DGF es compleja con contribuciones de factores derivados de donantes tal como la edad del donante y la duración de la isquemia, y factores receptores tal como lesión por reperfusión, respuestas inmunológicas y tratamiento con medicamentos inmunosupresores.

Los componentes de la cascada del complemento y la activación del complemento desempeñan un papel fundamental como mediadores de rechazo del trasplante y la lesión por isquemia-reperfusión conduce a DGF. Los estudios en animales han establecido un papel clave para el complemento en la lesión por reperfusión isquémica. Por ejemplo, Eculizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra C5, bloquea la activación del complemento y se demostró que previene la función retardada de injerto en un subconjunto de pacientes con trasplante renal de alto riesgo (ver, *por ejemplo*, Horizon Scanning Research and Intelligence Centre brief, 2016 September; Johnson *et al.* (2015) *Curr Opin Organ Transplant* 20(6):643-651; Yu *et al.* (2016) *Am J Transplant* 16(9):2589-2597). La deposición granular de C4d se asoció con DGF en receptores de aloinjerto renal humano (Kikić *et al.* (2014) *Transpl Int* 27(3):312-321). El aumento en la producción de C3 se asocia con el rechazo al trasplante del riñón (Pratt *et al.* (2002) *Nat Med* 8(6):582-587; Damman *et al.* (2011) *Nephrol Dial Transplant* 26(7):2345-2354). Por lo tanto, los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente, se pueden usar como un agente terapéutico para prevenir o mejorar o eliminar el rechazo al trasplante y DGF.

2. Usos Terapéuticos

a. Enfermedades Inflamatorias Inmunomediadas

Los polipéptidos de u-PA modificados descritos en la presente se pueden usar para tratar enfermedades inflamatorias. Las enfermedades inflamatorias que se pueden tratar con

proteasas incluyen enfermedades inflamatorias agudas y crónicas. Los ejemplos de enfermedades inflamatorias incluyen enfermedades del sistema nervioso central (SNC), enfermedades autoinmunitarias, condiciones de hiperrespuesta de las vías respiratorias tal como asma, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal y lesión inflamatoria aguda del tejido mediada por el complejo inmunitario (IC).

La encefalomielitis autoinmunitaria experimental (EAE) puede servir como modelo para la esclerosis múltiple (MS) (Piddlesden *et al.,* (1994) *J Immunol* 152:5477). La EAE se puede inducir en una cantidad de especies genéticamente susceptibles mediante inmunización con mielina y componentes de mielina tal como proteína básica de mielina, proteína proteolípida y glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG). Por ejemplo, EAE inducida por MOG recapitula características esenciales de la MS humana que incluyen el curso clínico crónico, recidivante de la enfermedad, la tríada patohistológica de inflamación, gliosis reactiva y la formación de placas desmielinizadas confluentes grandes. Los polipéptidos de u-PA modificados se pueden evaluar en modelos animales de EAE. Se administran polipéptidos de u-PA modificados, tal como mediante inyección intraperitoneal diaria, y se monitorea el curso y la progresión de los síntomas en comparación con los animales de control. Los niveles de componentes del complemento inflamatorio que pueden exacerbar la enfermedad también se pueden medir mediante el ensayo de la actividad del complemento en suero en un ensayo hemolítico y mediante el ensayo para la deposición de componentes del complemento, tal como, por ejemplo, C1, C3 y C9.

La activación del complemento modula la inflamación en enfermedades tal como artritis reumatoide (RA) (Wang *et al.,* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 92*:8955). Los polipéptidos de u-PA modificados se pueden usar para tratar la RA. Por ejemplo, los polipéptidos de u-PA se pueden inyectar local o sistémicamente. Los polipéptidos de u-PA modificados se pueden dosificar diariamente o semanalmente. Los polipéptidos de u-PA PEGilados se pueden usar para reducir la inmunogenicidad. En un ejemplo, la artritis inducida por colágeno tipo II (CIA) se puede inducir en ratones como un modelo de enfermedad articular inflamatoria autoinmunitaria que es histológicamente similar a RA caracterizada por sinovitis inflamatoria, formación de pannus y erosión del cartílago y el hueso. Para inducir la CIA, colágeno bovino tipo II (B-CII) en presencia de adyuvante de Freund completo se puede inyectar por vía intradérmica en la base de la cola. Después de 21 días, los ratones se pueden volver a inmunizar usando un protocolo idéntico. Para examinar los efectos de un polipéptido de u-PA, 3 semanas después de la exposición inicial con B-CII, se puede administrar un polipéptido de u-PA o control por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas. Los ratones se pueden sacrificar 7 semanas después de la inmunización inicial para

el análisis histológico. Para evaluar el efecto terapéutico de un polipéptido de u-PA sobre la enfermedad establecida, se puede administrar un polipéptido de u-PA diariamente durante un total de 10 días después del inicio de artritis clínica en una o más extremidades. El grado de hinchazón en las articulaciones inicialmente afectadas se puede monitorear midiendo el espesor de la pata usando pinzas. En ambos modelos, el suero se puede extraer de ratones para ensayos hemolíticos y medición de marcadores de activación del complemento tal como, por ejemplo, C5a y C5b-9. En otro ejemplo, los modelos de primates están disponibles para tratamientos de RA. La respuesta de articulaciones sensibles e hinchadas se puede monitorear en sujetos tratados con polipéptidos de u-PA y controles para evaluar el tratamiento con polipéptidos de u-PA.

Se puede usar polipéptido de u-PA modificado para tratar lesiones inflamatorias agudas mediadas por complejo inmunitario (IC). La lesión mediada por CI se provoca por una respuesta inflamatoria local contra la deposición de CI en un tejido. La respuesta inflamatoria resultante se caracteriza por edema, neutrofilia, hemorragia y, finalmente, necrosis tisular. Se puede estudiar la lesión tisular mediada por CI en una reacción *in vivo* de Arthus (RPA). En resumen, en la reacción de RPA, se inyecta un exceso de anticuerpo (tal como, por ejemplo, albúmina de huevo anti-pollo IgG de conejo) en la piel de animales, tal como, por ejemplo, ratas o cobayos, que previamente se infundieron por vía intravenosa con el antígeno correspondiente (*es decir*, albúmina de huevo de pollo) (Szalai *et al.,* (2000) *J Immunol* 164:463). Inmediatamente antes del inicio de una reacción de RPA, se puede administrar un polipéptido de u-PA o un control en bolo al mismo tiempo que el antígeno correspondiente mediante una inyección intravenosa a través de la vena femoral derecha. De manera alternativa, se puede administrar un polipéptido de u-PA durante la hora inicial de la reacción de RPA, comenzando inmediatamente después de la inyección del antígeno y justo antes de la inyección dérmica del anticuerpo. Los efectos de un polipéptido de u-PA en la generación de lesión tisular mediada por CI dependiente del complemento se pueden evaluar en varios momentos después del inicio de RPA mediante la recolección de sangre para determinar la actividad hemolítica en suero y mediante la recolección del área infectada de la piel para la cuantificación del tamaño de la lesión.

Los polipéptidos de u-PA terapéuticos, tal como aquellos descritos en la presente, se pueden usar para tratar la sepsis y la sepsis grave que puede provocar un choque letal. Se puede usar un modelo de choque letal mediado por el complemento para probar los efectos de un polipéptido de u-PA como agente terapéutico. En uno de estos ejemplos, las ratas se pueden cebar con una cantidad traza de lipopolisacárido (LPS), seguido de la administración de un anticuerpo monoclonal contra un inhibidor de membrana del complemento (anti-Crry)

(Mizuno *et al.,* (2002) *Int Arch Allergy Immunol* 127:55-62). Se puede administrar un polipéptido o control de u-PA en cualquier momento durante el curso del inicio del choque letal, tal como antes del cebado de LPS, después del cebado de LPS o después de la administración anti-Crry, y se puede evaluar el rescate de ratas del choque letal.

b. Enfermedad neurodegenerativa

La activación del complemento exacerba la progresión de la enfermedad de Alzheimer (AD) y contribuye a la pérdida de neurita en los cerebros de AD. Los polipéptidos de u-PA modificados descritos en la presente se pueden usar para tratar AD. Los modelos de ratón que imitan algunas de las características neuropatológicas y de comportamiento de la AD se pueden usar para evaluar los efectos terapéuticos de los polipéptidos de u-PA. Los ejemplos de modelos de ratón transgénicos incluyen introducir la proteína precursora amiloide humana (APP) o la proteína presenilina 1 (PS1) con mutaciones que producen enfermedad en ratones bajo el control de un promotor agresivo. Estos ratones desarrollan características de AD incluyendo aumentos en placas beta-amiloides y neuritas distróficas. Los ratones transgénicos dobles para proteínas mutantes APP y PS1 desarrollan un mayor número de placas beta-amiloides fibrilares y muestran glia activada y factores del complemento asociados con la placa. Los polipéptidos de u-PA se pueden administrar, tal como mediante inyecciones intraperitoneales o intravenosas diarias, y el curso y la progresión de los síntomas se supervisan en comparación con los animales de control.

c. Enfermedad cardiovascular

Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente se pueden usar para tratar enfermedades cardiovasculares. Los polipéptidos de u-PA se pueden usar en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares que incluyen lesión por reperfusión isquémica resultante de accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, derivación cardiopulmonar, injerto de derivación de arteria coronaria, angioplastia o hemodiálisis. polipéptidos de u-PA también se pueden usar en el tratamiento de la respuesta inflamatoria asociada con derivación cardiopulmonar que puede contribuir a lesión tisular. Generalmente, un polipéptido de u-PA se puede administrar antes, concomitantemente o después de un tratamiento o evento que induce una lesión por reperfusión isquémica mediada por el complemento. En un ejemplo, se puede administrar un polipéptido de u-PA a un sujeto antes del tratamiento de un sujeto mediante un evento inductor de lesión isquémica mediado por complemento, tal como, por ejemplo, injerto de derivación de arteria coronaria de angioplastia.

Los efectos de un polipéptido de u-PA en el tratamiento de la lesión por reperfusión isquémica se pueden evaluar en modelos animales de la lesión. En uno de estos modelos, la isquemia miocárdica se induce en conejos que han tenido una incisión hecha en su pericardio

anterior colocando una sutura de seda 3-0 alrededor de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD) 5-8 mm desde su origen y apretando la ligadura para que el vaso se ocluya completamente (Buerke *et al.,* (2001) *J Immunol* 167:5375). Un polipéptido de u-PA, tal como, por ejemplo, un polipéptido de u-PA modificado, o un vehículo de control tal como solución salina, se puede administrar por vía intravenosa en dosis crecientes como un bolo 55 minutos después de la oclusión coronaria (*es decir*, 5 minutos antes de la reperfusión). Cinco minutos más tarde (*es decir*, después de un total de 60 minutos de isquemia) la ligadura LAD puede ser desatada y el miocardio isquémico puede ser reperfundido durante 3 horas. Al final del período de reperfusión, la ligadura alrededor de LAD se aprieta. Los efectos de un polipéptido de u-PA sobre la lesión isquémica se pueden analizar evaluando los efectos sobre la necrosis miocárdica, los niveles plasmáticos de creatina cinasa y los marcadores de activación de neutrófilos tal como, por ejemplo, actividad mieloperoxidasa y liberación de radicales superóxido.

En otro modelo de lesión miocárdica mediada por complemento sostenida tras la perfusión de corazones de ratón aislados con solución amortiguadora Krebs-Henseleit que contiene plasma humano al 6%, se puede usar tratamiento con polipéptidos de u-PA modificados para limitar el daño tisular al corazón. En este ejemplo, la solución amortiguadora utilizado para perfundir los corazones se puede complementar con dosis variables de polipéptidos de u-PA modificados. Los corazones perfundidos se pueden ensayar para la deposición de C3 y C5b-9 humanos, presión de perfusión de la arteria coronaria, presión diastólica final y frecuencia cardíaca.

Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente se pueden usar como agentes terapéuticos antes o después de una derivación cardiopulmonar (CPB) o injerto de derivación de arteria coronaria para inhibir la respuesta inmunitaria inflamatoria que a menudo sigue a la derivación y que puede contribuir a la lesión tisular. Se puede usar una recirculación *in vitro* de sangre entera en un circuito de derivación extracorpórea para estimular los cambios en las plaquetas y leucocitos y la activación inducida del complemento por CPB (Rinder *et al*. (1995) *J. Clin. Invest.* 96:1564). En Este modelo, la adición de un polipéptido de u-PA o solución amortiguadora de control, en dosis variables, se puede adicionar a un paquete de transferencia que ya contiene sangre de un donante sano y heparina porcina, justo antes de la adición de la sangre al circuito extracorpóreo. Se pueden extraer muestras de sangre a 5, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos después de la recirculación y analizarse para estudios de complemento tal como, por ejemplo, ensayos hemolíticos y/o ensayos de activación del complemento para medir C5a, C3a y/o sC5b-9. Se puede usar una muestra de pretratamiento de sangre extraída antes de su adición al circuito extracorpóreo

como un control. Se puede realizar citometría de flujo de muestras de sangre para determinar niveles de moléculas de adhesión en poblaciones de leucocitos circulantes (*es decir*, neutrófilos) en la sangre tal como, por ejemplo, niveles de CD11b y P-selectina.

d. Degeneración macular relacionada con la edad (AMD)

Los polipéptidos de u-PA modificados descritos en la presente se pueden usar para tratar la degeneración macular relacionada con la edad (AMD). La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) que se puede tratar con proteasas incluye AMD húmeda, AMD seca y atrofia geográfica.

Están disponibles numerosos modelos animales de AMD que imitan muchas de las características del trastorno humano (Pennesi *et al*. (2012) *Mol. Aspects Med.* 33(4):487-509)). Se mostró que las mutaciones en los genes de la ruta del complemento aumentan o disminuyen la susceptibilidad a la AMD (Edwards *et al*. (2005) *Science* 308(5720):421-424; Hageman *et al.* (2005) *Proc. Nat. Acad. Sci* 102(20): 7227-7232; Klein *et al.* (2005) *Science* 308(5720):385-389). Por ejemplo, en el factor H del complemento (CFH), que normalmente interactúa con C3b, el polimorfismo de nucleótido único Y402H impidió la unión de C3b con el factor B, lo que condujo a la inhibición de la formación de C3. Y402H se asocia con un mayor riesgo de AMD en personas y la mutación se identificó previamente en 43-59% de los pacientes con AMD (Haines *et al*. (2005) *Science* 308(5720): 419-421; Thakkinstian *et. al.* (2006) *Hum. Mol. Genet.* 15 (18): 2784-2790; Zareparsi *et al.* (2005) *Am. J. Hum. Genet.* 77 (1): 149-153).

Ratones genéticamente modificados que carecen de la capacidad de hacer que el CFH desarrolle características de AMD, incluidas las anomalías retinianas, disminución de la agudeza visual y deposición del complemento (Coffey *et al*. (2007) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 104:16651-16656). Mutaciones en proteínas del complemento Factor B (Montes *et al.* (2009) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 106 (11): 4366-4371), C2 (Gold *et al.* (2006) *Nat. Genet.* 38 (4): 458-462), and C3 (Maller *et al.* (2007) *Nat. Genet.* 39 (10): 1200-1201; Yates *et al.* (2007) *New Engl. J. Med.* 357 (6): 553-561) están asociados con un mayor o menor riesgo de desarrollar AMD en función de su impacto en la expresión y/o actividad de las diversas proteínas del complemento (Reynolds *et al*. (2009) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50 (12): 5818-5827).

Las proteasas de u-PA modificadas, tal como proteasas de u-PA modificadas proporcionadas en la presente, donde se altera una actividad, tal como especificidad o selectividad del sustrato, de la proteasa de u-PA para escindir la proteína C3 de complemento se puede utilizar como agentes terapéuticos. Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente se administran, por ejemplo, mediante inyección intravítrea o subretiniana o intrarretiniana bimensual, y el curso y la progresión de los síntomas se

monitorean en comparación con animales o sujetos de control. Los niveles de componentes del complemento que pueden exacerbar la enfermedad también se pueden medir mediante ensayo de actividad del complemento en suero en un ensayo hemolítico y mediante ensayo para la deposición de componentes del complemento, tal como, por ejemplo, C1, C3 y C9.

La activación del complemento juega un papel en la progresión de la enfermedad en la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) (ver, *por ejemplo*, Bradley *et al*., (2011) *Eye* 25:683-693; Gemenetzi *et al*. (2016) 30:1-14). Los polipéptidos de u-PA modificados se pueden usar para tratar la AMD. Por ejemplo, los polipéptidos de u-PA o una composición farmacéutica que contiene polipéptidos de u-PA, tal como los polipéptidos de u-PA modificados descritos en la presente, se pueden inyectar por vía intravítrea, intrarretiniana, subretiniana o de forma periocular. Los polipéptidos de u-PA modificados se pueden dosificar diariamente o semanalmente o con menos frecuencia, tal como, por ejemplo, mensualmente o con menos frecuencia, tal como bimensualmente. Para AMD, es probable la dosificación mensual de polipéptidos de uPA modificados que no se “modifican” adicionalmente para una duración prolongada en el ojo (*por ejemplo*, proteínas de fusión, PEGilación, etc.) (también se contempla la dosificación bimensual). Puede ser posible después de la “modificación” apropiada, cada 3 meses (o con menos frecuencia). Los polipéptidos de u-PA modificados se pueden modificar, tal como mediante PEGilación para reducir la inmunogenicidad potencial y/o para aumentar la semivida en suero. Para AMD, se utiliza dosificación mensual o dosificación bimensual de polipéptidos de u-PA modificados que no se modifican adicionalmente para una duración prolongada en el ojo (*por ejemplo,* proteínas de fusión, PEGilación). Si se modifica, tal como mediante PEGilación, la dosificación se puede efectuar cada 3 meses o más.

e. Trasplante de órganos

Función retardada de injerto (DGF)

Los polipéptidos de u-PA modificados descritos en la presente se pueden usar para tratar la función retardada de injerto (DGF), que incluye, tal como, por ejemplo, DGF como resultado de lesión por isquemia-reperfusión en receptores de trasplante de riñón. Los polipéptidos de u-PA también se pueden usar en el tratamiento de la respuesta inflamatoria asociada con trasplante de órgano que puede contribuir a lesión tisular. Generalmente, un polipéptido de u-PA se puede administrar antes, concomitantemente o después de un tratamiento o evento que induce una lesión por reperfusión isquémica mediada por el complemento. En un ejemplo, se puede administrar un polipéptido de u-PA a un sujeto antes del tratamiento de un sujeto mediante un evento inductor de lesión isquémica mediado por complemento, tal como por ejemplo trasplante de riñón o aloinjerto de riñón. Los efectos de

un polipéptido de u-PA en el tratamiento de la función retardada de injerto, por ejemplo, la función retardada de injerto como resultado de lesión por isquemia-reperfusión, se pueden evaluar en modelos animales de la lesión, que imitan las características mostradas en aloinjertos o trasplantes de riñón humano.

La presencia de biomarcadores tempranos de disfunción temprana del injerto que conducen a DGF, incluidos biomarcadores para lesión de células epiteliales tubulares, puede indicar la necesidad de tratamiento. Se han identificado biomarcadores de DGF (*es decir,* creatina sérica) (Malyszko *et al.* (2015) *Nature Scientific Reports* 5:11684; Wanga *et al.* (2015) PLoS One 10(9):e0136276). La detección temprana de biomarcadores para DGF e intervención terapéutica, tal como, por ejemplo, tratamiento terapéutico con un polipéptido de u-PA modificado, puede mejorar los resultados clínicos.

La activación del complemento modula el progreso de la enfermedad en trastornos tal como la función retardada de injerto después del trasplante de órganos, por ejemplo, trasplante de riñón (Yu *et al*. (2016) *Am J of Transplantation* 16(9):2589-2597). Los polipéptidos de u-PA modificados se pueden usar para tratar la DGF. Por ejemplo, los polipéptidos de u-PA se pueden administrar para administración sistémica o se pueden inyectar directamente en el injerto o los tejidos circundantes. Los polipéptidos de u-PA modificados se pueden administrar antes, durante o después del trasplante. Los polipéptidos de u-PA modificados se pueden dosificar diariamente o semanalmente o menos frecuentemente, tal como, por ejemplo, mensualmente o menos frecuentemente, tal como bimensualmente. En algunos casos se administra una dosis sistémica única del polipéptido de u-PA modificado. También se consideran múltiples infusiones del polipéptido de u-PA modificado durante varias horas.

Los polipéptidos de u-PA modificados se pueden administrar de forma crónica, si es necesario, por ejemplo, los polipéptidos de u-PA modificados, tal como los polipéptidos de u-PA modificados descritos en la presente, se pueden administrar diariamente o en otro cronograma para mantener una cantidad eficaz en el receptor de aloinjerto. Los polipéptidos de u-PA modificados se pueden usar para prolongar la supervivencia del aloinjerto en un receptor, en particular, la supervivencia crónica del aloinjerto. Los polipéptidos de u-PA PEGilados se pueden usar para reducir la inmunogenicidad.

3. Terapias de combinación

Los polipéptidos de u-PA proporcionados en la presente se pueden usar en combinación con otros fármacos y agentes terapéuticos existentes para tratar enfermedades y condiciones. Estos tratamientos se pueden realizar junto con otros fármacos antiinflamatorios y/o agentes terapéuticos. Los ejemplos de fármacos y agentes

antiinflamatorios útiles para terapias de combinación incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID) que incluyen salicilatos, tal como aspirina, NSAID tradicionales tal como ibuprofeno, naproxeno, ketroprofeno, nabumetona, piroxicam, diclofenaco o indometacina, e inhibidores selectivos de Cox-2 tal como celecoxib (vendido bajo la marca registrada Celebrex®) o Rotecoxina (vendido bajo la marca registrada Vioxx®). Otros compuestos útiles en terapias de combinación incluyen antimetabolitos tal como metotrexato y leflunomida, corticosteroides u otros esteroides tal como cortisona, dexametasona o prednisona, analgésicos tal como acetaminofeno, aminosalicilatos tal como mesalamina y agentes citotóxicos tal como azatioprina (vendida bajo la marca registrada Imuran®), ciclofosfamida (vendida bajo la marca registrada Cytoxan®) y ciclosporina A. Los agentes adicionales que se pueden usar en terapias de combinación incluyen modificadores de respuesta biológica. Los modificadores de respuesta biológica pueden incluir inhibidores de citocinas proinflamatorias que incluyen inhibidores de TNF-alfa tal como etanercept (vendido bajo la marca registrada Enbrel®), infliximab (vendido bajo la marca registrada Remicade®) o adalimumad (vendido bajo la marca registrada Humira®), e inhibidores de IL-1 tal como anakinra (vendido bajo la marca registrada Kineret®). Los modificadores de respuesta biológica también pueden incluir citocinas antiinflamatorias tal como IL-10, agentes dirigidos a linfocitos B tal como anticuerpos anti-CD20 (vendidos bajo la marca registrada Rituximab®), compuestos dirigidos a antígenos T, bloqueadores de moléculas de adhesión, antagonistas del receptor de quimiocinas, inhibidores de cinasa tal como inhibidores de proteína activada por mitógeno (MAP) cinasa, cinasa N-terminal c-Jun (JNK), o factor nuclear (NF) κB (NFκB), y ligandos de receptor activado por proliferador de peroxisoma (PPAR-γ). Los agentes adicionales que se pueden usar en terapias de combinación incluyen inmunosupresores. Los inmunosupresores pueden incluir tacrolimus o FK-506; ácido micofenólico; inhibidores de calcineurina (CNI); CsA; sirolimus u otros agentes conocidos para suprimir el sistema inmunitario.

Los polipéptidos de u-PA proporcionados en la presente también se pueden usar en combinación con agentes que se administran para tratar enfermedades cardiovasculares y/o se administran durante procedimientos para tratar enfermedades cardiovasculares tal como, por ejemplo, aquellos descritos en la presente que contribuyen a condiciones inflamatorias asociadas con lesiones por isquemia-reperfusión mediadas por el complemento. Por ejemplo, los polipéptidos de u-PA proporcionados se pueden administrar en combinación con anticoagulantes. Ejemplos de anticoagulantes de ejemplos incluyen, pero no se limitan a, heparina, warfarina, acenocumarol, fenindiona, EDTA, citrato, oxalato e inhibidores directos de trombina tal como argatrobán, lepirudina, bivalirudina y ximelagatrán.

Los polipéptidos de u-PA proporcionados en la presente también se pueden usar

en combinación con agentes que se administran para tratar polipéptidos DGF. Los u-PA proporcionados en la presente pueden, por ejemplo, administrarse en combinación con un agente inmunosupresor. Esta combinación es útil para prolongar la supervivencia del aloinjerto en un receptor, en particular, la supervivencia crónica del aloinjerto. En modalidades preferidas, la combinación se formula y prepara de modo que sea adecuada para la administración crónica al receptor del aloinjerto, por ejemplo, se emplean formulaciones estables. En ciertas modalidades, la combinación se formula y prepara de modo que es adecuada para la administración simultánea de los polipéptidos de u-PA modificados y el fármaco inmunosupresor al receptor del aloinjerto. En ciertas modalidades, la combinación se formula y prepara de modo que es adecuada para la administración secuencial (en cualquier orden) de los polipéptidos de u-PA modificados y el fármaco inmunosupresor al receptor del aloinjerto.

Los polipéptidos de u-PA proporcionados en la presente también se pueden usar en combinación con otros agentes que se administran para tratar la degeneración macular. Por ejemplo, los polipéptidos de u-PA modificados se pueden administrar con uno o más de ranibizumab (vendido bajo el nombre comercial Lucentis™); bevacizumab (vendido bajo el nombre comercial Avastin™); pegaptanib sódico (vendido bajo el nombre comercial Macugen™); aflibercept (vendido bajo el nombre comercial Eylea™); y verteporfina (vendido bajo el nombre comercial Visudyne™). Los polipéptidos U-PA proporcionados en la presente también se pueden usar en combinación con un telescopio implantable, tratamiento con láser o fotocoagulación con láser, cirugía y/o terapia fotodinámica, solo o en combinación con la verteporfina terapéutica, para tratar la degeneración macular.

Los agentes adicionales, tal como otros inhibidores del complemento, se pueden usar como fármacos antiinflamatorios en terapia de combinación con polipéptidos de u-PA modificados como se describe en la presente. Los ejemplos de estos otros inhibidores de complemento incluyen el factor de veneno de cobra (CVF), moléculas de polianiónicos tal como heparina, sulfato de dextrano, sulfato de polivinilo, polilisina, o suramina, moléculas naturales tal como K-76COOH, ácido rosmarínico, o extracto de la hierba medicinal china Ephedra, moléculas sintéticas tal como afamastat mesilato (FUT-175), un inhibidor sintético de C1s (C1s-INH-248), o un inhibidor contra C1s y fD (BCX-1470), inhibidores de péptidos tal como la compstatina, inhibidores de anticuerpos de complemento tal como anti-C5 (N19-8), anticuerpos humanizados anti-C5 (h5G1.1), anti-C6, o anti-C8, y formas solubles de reguladores de complemento de membrana tal como soluble CR1 (sCR1), soluble DAF (sdaf), soluble MCP (SMCF), o soluble CD59 (sCD59) (Morgan *et al.,* (2003) *Mol Immunol.* 40:159).

Las composiciones farmacéuticas que contienen polipéptidos de u-PA descritos en

la presente se pueden usar para tratar cualquiera de una o más enfermedades o condiciones inflamatorias mediadas por la activación del complemento. También se proporcionan combinaciones de polipéptidos de u-PA y otro tratamiento o compuesto para el tratamiento de una enfermedad o condición inflamatoria. Los polipéptidos de u-PA y el agente antiinflamatorio pueden empaquetarse como composiciones separadas para administración juntos o de forma secuencial o intermitente. De manera alternativa, se pueden proporcionar como una sola composición para administración o como dos composiciones para administración como una sola composición. Las combinaciones se pueden empaquetar como kits, opcionalmente con reactivos adicionales, instrucciones de uso, viales y otros recipientes, jeringas y otros artículos para el uso de los polipéptidos de u-PA modificados.

I. EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se incluyen únicamente para fines ilustrativos y no se propone que limiten el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Clonación y expresión de polipéptidos de u-PA modificados y detección para polipéptidos de u-PA modificados que escinden C3 en el sitio QHAR/AS

A. Clonación del u-PA

Se clonó ácido nucleico que codifica para los aminoácidos 179-431 con la mutación C122S mediante numeración de quimotripsina (expuesta en 50SEQ ID NO:5) del polipéptido de u-PA humano (Uniprot P00749; expuesta en SEQ ID NO:1) en el vector de expresión pE-SUMO-AMP C-terminal al pequeño modificador tipo ubiquitina (SUMO). La construcción incluyó el péptido de señal (aminoácidos 1-20) y el dominio de proteasa (aminoácidos 179-431).

B. Generación de polipéptidos de u-PA modificados

Los polipéptidos de u-PA modificados se generaron por mutagénesis dirigida al sitio de Quikchange (Stratagene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con oligonucleótidos diseñados específicamente que sirvieron como cebadores para incorporar mutaciones diseñadas en el ADN recién sintetizado. Se configura una reacción de PCR que contiene el ADN de u-PA tipo silvestre como una plantilla y cebadores de oligonucleótidos diseñados para contener las mutaciones deseadas. Después de PCR, cada producto de reacción se digirió con DpnI para eliminar cadenas progenitoras de ADN metiladas de la madre. El ADN entonces se transformó en células *E. coli* XL-1 Blue Supercompetent (Stratagene) y se colocó en placas en agar selectivo que contiene 50 µg/ml de carbenicilina. El ADN de plásmido se aisló de clones seleccionados y se secuenció para verificar la incorporación de la o las mutaciones previstas en la o las ubicaciones seleccionadas dentro

del ADN que codifica para u-PA y la ausencia de cualquier mutación adicional no deseada.

C. Preparación de polipéptidos de u-PA

1. Transformación

El ADN que codifica para polipéptidos tipo silvestre y cada uno de los polipéptidos de u-PA variantes se clonó en el el vector de expresión pE-SUMO-AMP C-terminal al pequeño marcador y prodominio similar a ubiquitina (SUMO) como se detalla en la Sección A anterior, y las construcciones resultantes se transformaron en células *E. coli* BL21 Gold (DE3) (Agilent Technologies, número de catálogo: 230132). Se transformaron aproximadamente 50 µL de células BL21 Gold (DE3) químicamente competentes con 0.5 µL del ADN de plásmido apropiado (que habitualmente contiene 1 pg – 50 ng de ADN total). Las células y el ADN se incubaron en hielo durante 30 minutos, las células se sometieron a choque térmico a 42°C durante 45 segundos y se incubaron adicionalmente en hielo durante 2 minutos. Se adicionó a la mezcla 450 µL de medio Terrific Broth (TB) a temperatura ambiente (VWR International, número de catálogo 100219-866), y las células se incubaron en el medio TB durante 1 hora con agitación a 240 rpm a 37°C. Se esparcen 20 µL de esta mezcla de transformación en un medio YT 2x + placa de carbenicilina de 100 µg/ mL de Teknova (No. de cat.: Y4420) y se incuba durante la noche a 37°C.

2. Expresión de los polipéptidos de u-PA

Las células que contienen ADN que codifica para un polipéptido de u-PA deseado (habitualmente obtenido de una colonia única “confirmada” del proceso de transformación descrito anteriormente) se cultivaron en aproximadamente 50 mL de medio preparado mediante la combinación de 50 µL de carbenicilina, 0.3 mL de solución de lactosa al 20%, 5 mL de solución amortiguadora de fosfato y 45 ml de medio de caldo Terrific Broth (TB) base (Teknova, número de catálogo L0350). Las células y el medio de crecimiento se giraron a 400 rpm en un agitador Infors Multitron a 37°C. Después de 18 a 22 horas de crecimiento, las bacterias se sedimentaron por centrifugación a 7000 rpm en un tubo de centrifugación Falcon de 50 ml en una centrifugadora Beckman Sorval RC6 Plus con rotor de centrifugación Fiberlite F13-14x50cs (Thermo-Fisher) durante 10 minutos a 4ºC. Después de la centrifugación, el sobrenadante se decantó.

El sedimento celular del cultivo de 50 mL se resuspendió en 10 ml de solución amortiguadora de lisis celular A (Tris 50 mM, pH 8.0, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, Lisozima 0.1 mg/mL). El sedimento celular se resuspendió en solución amortiguadora A agitando a 240 rpm durante 1 h a 37ºC. La mezcla resultante se sometió a centrifugación a 7000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se decantó. Los sedimentos resultantes se volvieron a suspender en 10 ml de reactivo de extracción BugBuster® (Merck Millipore, NC9591474) que contiene

20 µL de Benzonasa™ (Millipore Sigma). Las células se resuspendieron por vórtice y agitación a 240 rpm durante 1 hora a 37ºC. Después de agitación, el material insoluble restante se sedimentó por centrifugación a 10000 rpm durante 15 minutos a 4ºC, y el sobrenadante se decantó. El sedimento resultante se resuspendió mediante homogeneización en 10 ml de solución amortiguadora de lavado A [Tris 50 mM (pH 8.0), NaCl 300 mM y Triton X-100 al 1%] usando un homogeneizador Power Gen 500 (Fisher Scientific, 14-261-04P). Esta mezcla, que contiene cuerpos de inclusión de polipéptido de u-PA resuspendidos (IB) se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos a 4ºC y el sobrenadante se descartó. Los nuevos sedimentos se volvieron a suspender en 10 mL de solución amortiguadora de lavado B (Tris 50 mM (pH 8.0)) y se homogeneizaron repetidamente hasta que el sedimento se dispersó bien. La mezcla resultante se centrifugó nuevamente a 10000 rpm durante 15 minutos a 4ºC, el sobrenadante se decantó y el sedimento se dejó secar al aire durante 10 a 15 minutos. Este sedimento de cuerpos de inclusión de polipéptido de u-PA (IB) se puede almacenar a -20ºC o se puede usar inmediatamente para el despliegue y replegamiento descritos a continuación.

3. Desplegado de uPA

Los cuerpos insolubles de inclusión de proteína de fusión de polipéptido SUMO-u-PA se disolvieron y desnaturalizaron en 5 mL de solución amortiguadora de despliegue [6M GuHCl, 50 mM Tris pH 8, (Teknova, Número de catálogo: G0380)]. Se adicionó TDT recién preparada a una concentración final de 10 mM en el día del procedimiento de replegamiento. Esta solución de IB se agitó a 240 rpm a 37ºC durante al menos 1 hora (habitualmente 2 horas), o hasta que los cuerpos de inclusión se disolvieron completamente. La solución de IB totalmente disuelta es transparente, pero puede exhibir un tinte marrón.

4. Replegamiento de u-PA

La solución de 5 ml de polipéptido de u-PA desplegado descrito anteriormente se divide en dos alícuotas de 2.5 ml y cada alícuota se adiciona a 200 ml de solución amortiguadora de replegamiento [arginina 1.5 M, Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, GSH 5 mM (L-glutatión reducida, Sigma-Aldrich) y GSSG 4.0 mM (L-glutationa oxidada, Sigma-Aldrich)]. Esta solución que contiene polipéptidos de u-PA en solución amortiguadora de replegamiento se incubó en un agitador a 150 rpm durante 24 horas a temperatura ambiente para permitir que se llevara a cabo el plegado.

La solución de proteína resultante se transfirió a un tubo de diálisis de celulosa regenerada (VWR) Spectra/Por® de corte de peso molecular Dalton 12000-14000 (MWCO) que tiene aproximadamente 35 cm de longitud y se dializó en Bis-Tris 25 mM, pH 6.1. Las muestras se dializaron al menos durante la noche y, más habitualmente, durante varios días. Las muestras dializadas durante solo un día se incubaron a temperatura ambiente y las

muestras dializadas durante más de un día se incubaron a 4º C. La relación óptima entre el volumen de solución amortiguadora de diálisis total y el volumen de muestra total fue de al menos 100. Las proporciones más bajas habitualmente produjeron rendimientos más bajos de polipéptido de u-PA plegado adecuadamente. Seguido de la diálisis, las muestras de proteasa se retiraron del tubo de diálisis y se filtraron usando un matraz de 500 mL 0.22 µm (Millipore).

4. Purificación en columna de zimógeno

La solución de proteína entonces se purificó usando el sistema de flujo rápido sulfopropil sefarosa (SPFF). La columna se preparó mediante la adición de 6 mL de suspensión espesa SPFF Superflow (GE Lifesciences) (con aproximadamente 3 mL de resina) a cada columna Econo (BioRad), y la solución de almacenamiento se dejó drenar de la resina. Entonces se adicionaron 10 mL de Bis-Tris 25 mM pH 6.1, NaCl 1 M a la columna que contiene la resina y se dejó que la solución fluyera a través de la columna. Entonces, se adicionaron 10 mL de Bis-Tris 25 mM pH 6.1 a la columna que contiene la resina y la solución se dejó pasar. La parte inferior de la columna se tapa y se almacena con la adición de 10 mL de solución amortiguadora Bis-Tris 25 mM pH 6.1 para equilibrar la resina.

La solución de muestra de polipéptido de u-PA replegada y dializada se aplicó a la columna SPFF equilibrada, seguida de 10 ml de Bis-Tris 25 mM pH 6.1, NaCl 50 mM. El zimógeno de polipéptido de u-PA no activado se eluyó entonces con 4 ml de Tris 25 mM pH 7.5, NaCl 500 mM que se recolectó en un tubo Falcon 50 mL. Entonces, la muestra se diluyó con Tris 25 mM pH 7.5 a un volumen total de 12 ml.

5. Activación del zimógeno de u-PA

La muestra de 12 ml que contiene el zimógeno de polipéptido de u-PA purificado se diluyó mediante la adición de 12 ml de solución amortiguadora de activación (Tris 25 mM, pH 7.5, Benzamidina 20 mM). El zimógeno de polipéptido de u-PA entonces se convirtió en la proteasa u-PA activa correspondiente con la proteasa 1 específica tipo ubiquitina SUMO Protease (ULP-1) de *Saccharomyces cerevisiae*. La “activación” del zimógeno de polipéptido de u-PA se logró mediante la adición de 120 µg de ULP-1 al zimógeno purificado, agitar brevemente la solución e incubar la muestra durante la noche a temperatura ambiente.

6. Purificación de polipéptidos de u-PA activados

Los polipéptidos de u-PA activos se purificaron usando cromatografía de intercambio iónico. Antes de la cromatografía, la muestra se filtró con una unidad de filtro de 50 ml. Se acondicionó previamente una columna giratoria Vivapure Q con 5 ml de Tris 25 mM pH 7.5, NaCl 1 M y 10 ml de Tris 25 mM pH 7.5 seguido de centrifugación a 500 g en una centrífuga Sorvall Legend RT durante 5 minutos.

Cada muestra que contiene un polipéptido de u-PA activado se cargó en una columna de espín Q individual en lotes de 19 mL y se centrifugó a 500 g durante 5 minutos para cada corrida. Se recolectó el flujo que contiene u-PA activado sin etiqueta de SUMO y Zimógeno. El pH de la muestra de u-PA resultante se ajustó al adicionar 12 ml de ácido cítrico 25 mM, pH = 5.0 y 60 μL de ácido cítrico 1M. La solución de proteína resultante entonces se cargó en una columna giratoria Vivapure S preacondicionada. Esta columna se acondicionó previamente con 5 ml de Tris 25 mM pH 7.5, NaCl 1M y 10 mL de Tris 25 mM pH 7.5, seguido al centrifugar la columna a 500 g durante 5 minutos. Las muestras se cargaron en la columna S (HiTrap SP HP; GE Healthcare) en lotes de 19 ml y la columna se centrifugó a 500 g durante 5 minutos. El flujo a través de este proceso se descarta. La columna se "lavó" con 10 ml de citrato de sodio 25 mM pH 5.0, NaCl 20 mM. Después de lavar la columna, el tubo de recolección se reemplaza con un tubo nuevo que contiene 7 ml de solución amortiguadora de dilución Citrato de Sodio 50 mM pH 5.0. Entonces, se eluye el polipéptido de u-PA de la columna con 7 ml de Fosfato de Sodio 25 mM pH 7.0, NaCl 250 mM. La elusión, que contiene un polipéptido de u-PA, entonces se concentra e "intercambia solución amortiguadora" en solución salina amortiguada con citrato (CBS; Citrato de sodio 20 mM pH 5.0, NaCl 50 mM) usando una unidad de filtro Amicon Ultra-15 Centrifugal para lograr una concentración final de ≥60 μM (A_{280} de ≥2.6). La densidad óptica de las soluciones se midió usando un dispositivo Nanodrop. La calidad de la preparación se evaluó inicialmente mediante SDS-PAGE. Se cargaron dos μg de muestra de polipéptido de u-PA en solución amortiguadora de muestra 1X que contiene TCEP de disyuntor de unión en cada "carril" de un gel NovexBis-Tris de 4-12% PAGE de 12 pocillos y se ejecutaron en una solución amortiguadora MES Running 1X a 200 V durante 40 min. Las proteínas se "visualizaron" mediante tinción del gel con azul comassie seguido por destinción. Las fracciones que contienen bandas individuales que migran a aproximadamente 25 kDa se congelaron a presión en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso. La calidad de las muestras de polipéptidos de u-PA individuales se evaluó adicionalmente mediante ensayos de actividad y espectroscopia de masas.

D. Selección e identificación de polipéptidos de u-PA modificados que escinden C3 para inactivarla

Los polipéptidos de u-PA modificados se identificaron mediante la selección de una biblioteca de polipéptidos de u-PA modificados contra una serpina modificada (PAI-1) como se describe, por ejemplo en detalle en la Patente de Estados Unidos No. 8,211,428 (ver, también publicada la Publicación de solicitud de Estados Unidos No. US-2014-0242062-A1). Para el tamizado se utiliza una serpina inhibidora, o fragmento de esta, capaz de formar un

intermedio de enzima acilo covalente entre la serpina y la proteasa. En general, la serpina utilizada es una que se dirige normalmente *in vivo* a la proteasa. En el ensayo, una serpina modificada mediante el reemplazo de su bucle de sitio reactivo (RSL) para incluir la secuencia diana (*es decir*, el sitio activo en C3) captura proteasas modificadas que escindirán el sitio diana para formar complejos estables. La proteasa modificada capturada se aísla/identifica. Para u-PA, PAI-1, PAI-2, PAI-3, particularmente PAI-1 que es un inhibidor de los mismos, son serpinas cognadas. La serpina PAI-1 se modificó reemplazando los residuos indicados a continuación con QHARASHLG (residuos 737-745 de C3, SEQ ID NO: 47), que es el sitio activo de C3 humano. Todos los polipéptidos de u-PA modificados se seleccionan de modo que se escinden dentro del sitio activo de C3. En particular, se escinden entre R y A.

Q H A R↓A S H L

ATIII "cebo" (A CONTINUACIÓN) con secuencia insertada QHARASHLG (corresponde a un sitio de escisión inactivado en C3 (residuos 737-745 de SEQ ID NO: 47)):

```
           10         20         30         40         50         60
CHHPPSYVAH LASDFGVRVF QQVAQASKDR NVVFSPYGVA SVLAMLQLTT GGETQQQIQA
           70         80         90        100        110        120
AMGFKIDDKG MAPALRHLYK ELMGPWNKDE ISTTDAIFVQ RDLKLVQGFM PHFFRLFRST
          130        140        150        160        170        180
VKQVDFSEVE RARFIINDWV KTHTKGMISH LLGTGAVDQL TRLVLVNALY FNGQWKTPFP
          190        200        210        220        230        240
DSSTHRRLFH KSDGSTVSVP MMAQTNKFNY TEFTTPDGHY YDILELPYHG DTLSMFIAAP
          250        260        270        280        290        300
YEKEVPLSAL TNILSAQLIS HWKGNMTRLP RLLVLPKFSL ETEVDLRKPL ENLGMTDMFR
          310        320        330        340        350        360
QFQADFTSLS DQEPLHVALA LQKVKIEVNE SGTVASSSTL RRQHARASHL EIIIDRPFLF
          370
VVRHNPTGTV LFMGQVMEP
```

Las mutaciones en PAI-1 modificado anteriormente son como sigue:

RCL	LRRQHARASHL	341	350
Mutación	V1C	1	1
Mutación	N150H	150	150
Mutación	K154T	154	154
Mutación	Q319L	319	319
Mutación	A340L	340	340
Mutación	V341R	341	341
Mutación	I342R	342	342
Mutación	V343Q	343	343
Mutación	S344H	344	344
Mutación	M347A	347	347
Mutación	A348S	348	348
Mutación	P349H	349	349
Mutación	E350L	350	350
Mutación	M354I	354	354

La Tabla 14, en el Ejemplo 2 a continuación, establece mutaciones y proporciona SEQ ID para dominios de proteasa de ejemplo de polipéptidos de u-PA modificados que contienen las mutaciones. La numeración es numeración de quimotripsina. Los polipéptidos de u-PA modificados se generaron y seleccionaron para inactivar C3, con las mutaciones indicadas. Si bien los SEQ ID NOs., hacen referencia a los dominios de proteasa, se entiende que las mutaciones se pueden incluir en polipéptidos precursores u-PA modificados maduros y de longitud completa. El reemplazo C122S, u otro reemplazo conservado para S, se incluye para reducir la agregación; aunque ventajosa, es opcional. Para u-PA modificado para uso para terapia génica o para pegilación, el reemplazo C122S no se incluye en el u-PA modificado o en el ácido nucleico codificador. C122 puede servir como un sitio para el conjugado de una porción de pegilación u otra modificación. Cuando se expresa *in vivo*, la agregación generalmente no es una preocupación. También para la cual la forma activa es una forma de dos cadenas unida por un enlace de disulfuro, el Cys libre en el residuo 122 generalmente no se modifica a Ser de modo que esté disponible para formar el enlace de disulfuro.

Ejemplo 2

Escisión *in vitro* de la proteína C3 de complemento

La actividad de los polipéptidos de u-PA modificados para la escisión por inactivación de C3 se determinó al medir la cantidad de C3 humana intacta restante después de la incubación de la proteína C3 humana de complemento de sustrato con diversas concentraciones de cada proteasa modificada durante 1 hora a 37°C. De acuerdo con este ensayo, la señal se genera en la presencia de C3 humano intacto y se pierde a medida que la C3 se escinde**.**

Se incubó C3 humana purificada en plasma 2 μM (Complement Technologies; Tyler, TX) con los polipéptidos de u-PA modificados (0 – 250 nM) durante 1 hora a 37°C en solución amortiguadora que contiene Tris 50 mM, pH 8.0, NaCl 50 mM y Tween-20 0.01%. La actividad de los polipéptidos de u-PA modificados se inactivó mediante la adición de EGR-CMK (Haematologic Technologies, EGRCK-01) a una concentración final de 10 μM y la mezcla de polipéptido de u-PA modificado/hC3 se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Los niveles residuales de C3 humana no digerida se cuantificaron usando un tamiz de ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificada (vendido bajo la marca registrada AlphaScreen®; Perkin Elmer). Se incubaron cuentas aceptoras recubiertas de IgG α de ratón a 100 μg/mL (Perkin Elmer #6760606) con mAb de α-hC3a de ratón 5 nM (Abcam #ab11872-50) en Tris 50 mM, pH 8.0, NaCl 50 mM, Tween-20 al 0.01% y BSA al 0.2% para

formar la mezcla de cuentas aceptoras. La mezcla de cuentas aceptoras se protegió de la luz y se colocó en un agitador giratorio durante 30 – 60 minutos. Las mezclas de reacción de polipéptido hC3/u-PA modificado (preparadas anteriormente) se diluyeron 1600 veces en Tris 50 mM, pH 8.0, NaCl 50 mM, Tween-20 0.01%, BSA 0.2% y alícuotas de 4 μL se colocaron en pocillos duplicados de un Optiplate de 384 pocillos (Perkin Elmer #6007299). Se incubaron 8 μL de una mezcla de mAb/cuentas aceptoras de α-hC3 con 8 μL de pAb de cabra biotinilado 25 nM α-hC3 (preparado usando kit de sulfo-N-HS-LC-biotina EZ-Link de Thermo Scientific #21327 de la versión no biotinilada de Complement Technologies #A213). Entonces, la placa se protegió de la luz y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se adicionaron 4 μL de cuentas donantes recubiertas con estreptavidina de 100 μg/mL (Perkin Elmer #6760606) a cada pocillo y se incubaron durante 60 minutos, protegidas de la luz. La señal de pantalla alfanumérica (Excitación = 680 nm, Emisión = 570 nm) entonces se midió usando un lector de placas multietiqueta Envision 2104 (Perkin Elmer). Esta señal (correspondiente a la concentración de hC3 restante ([hC3]) se graficó en función de la concentración de Alterase® ([Alterase]) y los datos se ajustaron a la ecuación de cuatro parámetros a continuación para determinar la concentración de polipéptido de u-PA modificado (la concentración de Alterase®) necesaria para escindirse a través del 50% de hC3 (EC_{50}) disponible, la pendiente de pendiente de pendiente (Hill), así como las señales máxima (Max) y mínima (Min) en el ensayo.

$$[hC3] = Min + \frac{Max - Min}{1 + \left(\frac{[Alterase]}{EC_{50}}\right)^{Hill}}$$

La escisión de hC3 por la variante u-PA que contiene las mutaciones R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R (ver SEQ ID NO:21) se midió independientemente un total de 13 veces, usando 9 lotes diferentes de la proteasa. Se determinó que el valor promedio de EC_{50} para este polipéptido de u-PA modificado es 19 nM (n=13, SD=2.2); en el experimento para el cual se informan los resultados en la Tabla 14 a continuación, fue 24.5 nM.

Aproximadamente 600 polipéptidos de u-PA modificados que comprenden un dominio de proteasa con las mutaciones expuestas en la Tabla 14. Los resultados se exponen en la Tabla 14 a continuación. La mayoría de los polipéptidos de u-PA modificados analizados escindieron la proteína del complemento humano C3 significativamente más eficientemente (es decir, ED_{50} inferior) que el dominio de proteasa de u-PA tipo silvestre que contiene el reemplazo C122S; muchos con ED_{50} por debajo de 100 nM. Los polipéptidos incluyen el reemplazo C122S para evitar la agregación tras la expresión, por ejemplo, del dominio de

proteasa. En algunas modalidades, el polipéptido de u-PA modificado es de longitud completa que se activa para formar un polipéptido activado de dos cadenas. Para estas modalidades, el dominio de proteasa de u-PA modificado no incluye el reemplazo C122S (279 por numeración madura); la cisteína forma un enlace disulfuro (entre 148C y 279C por numeración madura, con referencia a SEQ ID NO:3)

Entre las variantes de u-PA analizadas se encuentran aquellas que fueron menos potentes que u-PA tipo silvestre, particularmente aquellas variantes para las cuales no se observó escisión (es decir, indicada como NA en la Tabla 14 a continuación) de hC3 durante el ensayo de una hora. Otras variantes de baja actividad se escindieron menos del 25% de hC3 durante el ensayo y, por lo tanto, no se les asignó un ED_{50}. En función de estos resultados, el experto en la técnica puede seleccionar mutaciones que aumentan la actividad de escisión para C3.

TABLA 14

SEQ ID NO*	**Cadena de mutación**	**ED50 (nM)**
749	R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L	0.92
678	R35W/R36Q/H37S/V38P/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L	2.38
277	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K82R/T97aI/L97bA/H99Q/K110aR/C122S/Y149R/M157K	2.47
280	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/K179R	2.49
278	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K92R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	3.04
614	F30Y/R35V/R36H/H37G/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bW/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149E/M157K	3.47
279	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K92S/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	3.48
276	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61R/K62R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	3.51
281	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/K179S	3.87
291	R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	4.38
690	F30Y/R35W/R36T/H37S/V38S/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157R/Q192Y	4.47
272	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	4.68
287	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61S/K62S/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	4.75
751	R35A/H37E/R37aG/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H9	4.76

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
	9Q/C122S/Y151L	
676	R35W/R36Q/H37S/V38T/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151P/M157R	4.78
668	F30Y/R35W/H37Y/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	4.92
977	V38E/T39W/V41R/D60aW/Y60bP/L97bG/H99L/C122S	4.94
682	R35W/R36K/H37S/V38E/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S/Q192H	5.01
792	R35Q/H37Y/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aQ/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	5.14
225	I17V/F30Y/R35Q/R36H/H37W/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A	5.21
750	R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192H	5.26
10	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	5.33
675	R35W/R36N/H37S/V38E/T39Y/Y40M/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157S	5.52
802	R35Y/H37D/V38E/T39W/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	5.57
288	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K82S/T97aI/L97bA/H99Q/K110aS/C122S/Y149R/M157K	5.82
744	R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/D97T/T97aE/L97bG/A98S/H99L/C122S	6.17
275	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R/M157K	6.24
753	R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	6.24
669	F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	6.35
286	F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/M157K	6.38
981	R35H/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158A	7.23
656	R35Q/R36H/H37Y/V38E/T39Y/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	7.33
705	R35W/H37P/R37aG/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	7.4
824	V38D/V41Q/D60aH/Y60bS/T97aW/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/R217E/K224R	7.48
731	F30Y/R35W/R36H/H37P/R37aQ/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	7.52
677	F30Y/R35W/R36Q/H37S/V38P/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157R	7.55
679	F30H/R35W/R36T/H37S/V38P/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99	7.59

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
	Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S	
613	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	7.64
707	F30Y/R35Y/R36H/H37N/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61E/R72H/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q169K	7.64
688	R35W/R36Q/H37S/V38S/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S/Q192H	8.04
752	R35W/H37G/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192T	8.07
19	R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	8.13
290	F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S	8.23
616	F30Y/R35V/R36H/H37G/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	8.3
670	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	8.44
285	F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	8.44
283	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/M157K	8.6
284	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S	8.78
683	F30Y/R35W/R36S/H37S/V38Q/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S/Q192N	8.86
727	F30Y/R35W/R36H/H37P/R37aD/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aE/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	8.9
799	R35Q/H37Y/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	8.95
949	R37aS/V38E/Y40V/V41R/H99L/C122S/Y151L/R217V	9.04
831	V38D/V41R/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217E	9.09
33	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	9.27
624	F30Y/R35V/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	9.54
223	I17V/F30Y/R35Q/R36H/H37W/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	9.65
617	F30Y/R35V/R36H/H37S/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bS/T97aM/L97bA/H99Q/C122S/Y149W/M157K	10.2
703	R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	10.3
706	N26D/F30Y/R35Y/R36H/H37E/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/R110dS/P114S/C122S/Y149R/M157K	10.3
732	F30Y/R35W/R36H/H37P/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bA/T97a	10.3

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
	E/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	
796	R35L/H37D/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	10.4
14	F30Y/R35W/R36H/H37P/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	10.6
29	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	10.6
979	R35H/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158S/E167K	10.6
24	R35Q/H37Y/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	10.7
633	F30Y/R35Y/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	10.8
12	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	10.8
708	F30Y/R35Y/R36H/H37E/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/T242A	11.1
557	F30Y/R35L/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A	11.3
724	F30Y/R35Y/R36H/H37P/R37aQ/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bH/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	11.3
882	V38D/V41R/L97bR/H99E/C122S/Y151L/R217E	11.4
335	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/R217E/K224R	11.5
746	R35Y/H37V/R37aW/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192T	11.6
615	F30Y/R35M/R36H/H37G/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bP/T97aF/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	11.7
684	F30Y/R35W/R36Q/H37S/V38T/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157K/Q192T	11.8
701	R35W/H37D/R37aP/V38E/T39W/V41R/D60aR/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	11.8
260	I17V/F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	11.9
218	I17V/F30Y/R35Q/H37W/V38D/Y40H/V41R/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K/T158A	12
978	R35H/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/I138V/E167K	12.1
680	F30Y/R35W/R36Q/H37S/V38E/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157T/Q192H	12.4
980	R35H/G37bD/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158S	12.4
794	R35H/H37P/R37aG/V38E/T39F/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	12.6
611	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97b	12.7

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
	A/H99Q/C122S/Y149R/M157K	
926	V38D/T39Y/Y40L/V41R/L97bI/H99E/C122S/R217E	12.8
224	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A	12.9
689	F30H/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40M/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	13
650	R35V/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40M/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	13.1
685	R35W/R36K/H37S/V38A/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157R/Q192T	13.3
628	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	13.5
717	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/N145S/S146V/T147M/D148G/Y149Q/L150F/M157K	13.6
275	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R/M157K	13.7
658	F30Y/R35I/R36H/H37D/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	14.1
373	R35V/V38E/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	14.4
800	R35Q/H37Y/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aN/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	14.5
957	V38E/Y40Q/V41L/L97bG/H99Q/C122S/R217T	14.5
983	R35H/V38E/T39Y/V41R/T56S/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158S	14.6
513	F30H/R35Q/H37W/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	14.7
300	R35Q/H37Y/V38E/T39Y/V41R/D60aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	14.7
745	R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41K/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192A	14.8
821	V38D/V41R/Y60bR/T97aW/L97bR/H99E/C122S/E175D/R217E/K224R	14.8
674	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/Y40H/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	15.1
823	V38D/V41L/Y60bP/T97aM/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/R217E/K224R	15.3
627	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	15.4
13	F30Y/R35W/R36H/H37N/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	15.7
681	F30Y/R35W/R36K/H37S/V38D/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157R/Q192T	15.9
382	V41R/H99Q/C122S/Y151L/R217V	16
959	V38E/Y40P/V41L/L97bG/H99L/C122S/Y151Q/R217E	16
950	V38E/Y40L/V41R/H99L/C122S/Y151L/R217S	16.1

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
956	V38E/Y40Q/V41L/L97bG/H99Q/C122S/Y151P/R217T	16.4
973	V38E/T39Y/V41R/D60aW/Y60bP/L97bR/H99I/C122S	16.4
20	R35W/H37D/R37aP/V38E/T39W/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	16.6
597	F30Y/R36H/H37F/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bD/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	16.8
664	F30Y/R35W/R36H/H37E/S37dP/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	16.8
733	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aA/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	17.4
469	R36H/V38D/V41R/A96D/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/T178S/R217D	17.5
830	V38D/V41R/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217A	17.7
653	F30H/R35Q/R36H/H37Y/V38E/T39Y/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	17.8
264	F30Y/R35W/R36K/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/K61E/I65T/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	17.9
604	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bS/T97aL/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	18
714	F30Y/R35Q/R36H/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aS/Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	18.1
743	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aG/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	18.1
666	I24N/F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40L/V41R/Y60bQ/N87D/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	18.2
36	V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S	18.2
217	F30Y/R35Q/H37W/V38D/Y40H/V41R/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K/T158A	18.3
263	F30Y/R35W/R36A/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/K61D/I65R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	18.4
221	F30Y/R35Q/R36H/H37W/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	18.6
289	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/K187R/K223R/K224R	18.9
687	R35W/R36Q/H37S/V38E/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S/Q192T	19
986	R35H/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/P60cS/L97bA/H99Q/C122S/I138V/E167K	19.4
18	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aT/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	19.5
222	I17V/F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	19.6
271	R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	19.9

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
982	R35H/V38E/T39Y/V41R/T56A/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S	19.9
538	F30Y/V38D/Y40F/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157R	20.2
953	V38E/Y40A/V41L/L97bG/H99Q/C122S/R217T	20.4
665	I24T/F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	20.6
292	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	20.7
219	I17V/F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A	21.6
747	R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41K/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192T	21.7
514	F30H/R35L/H37D/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K/R217E	21.8
713	F30Y/R35W/R36H/H37D/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aE/Y60bF/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	21.8
619	F30Y/R35L/R36H/H37G/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149M/M157K	22.1
505	I17V/F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	22.2
623	F30Y/R35V/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	22.6
11	R35W/R36H/H37N/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192H	22.8
360	R35V/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	22.8
729	F30Y/R35M/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	22.9
834	R35Q/V38D/V41R/L97bG/H99Q/C122S/Y151L	22.9
961	R37aS/V38E/Y40P/V41L/L97bG/H99Q/C122S/Y151Q/R217T	23.4
364	R35V/R37aE/V38E/Y40Q/V41L/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	23.5
486	F30H/V38D/V41R/A96G/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	23.7
311	T39L/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	23.7
265	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	23.8
34	Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	23.9
586	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/S146F/M157K/Q192H/K243Q	24.1
346	Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	24.1
262	F30Y/R35W/R36Q/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/K61L/I65V/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	24.4
21	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	24.5
832	R35Q/V38D/V41R/T97aS/L97bA/H99Q/C122S/Y151L	24.8
369	V41R/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217V	25.1
30	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	25.3

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
621	F30Y/R35V/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149E/M157K	25.4
754	R35A/H37T/R37aD/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192S	25.5
835	R35S/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L	25.7
836	R35S/V38D/V41L/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217Q	26.1
562	F30Y/R35H/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158S	26.3
738	R35Q/H37S/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	26.3
338	H37G/R37aD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	26.7
341	H37G/R37aD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E	26.8
741	R35W/H37D/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aE/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	26.9
795	R35Q/H37G/R37aD/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	27.1
798	R35Q/H37D/R37aK/V38E/T39F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	27.1
671	R35Y/R36H/H37S/V38D/T39Y/V41R/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	27.3
230	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	27.9
829	R37aS/V38D/V41Q/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217T	27.9
484	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	28.1
693	F30Y/R35K/R36H/H37E/R37aK/V38E/T39F/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	28.1
694	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bG/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	28.3
261	F30Y/R35W/R36Q/H37E/V38A/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/K61D/I65V/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	28.4
494	F30Y/R35H/V38D/Y40H/V41R/T56A/L97bA/H99Q/C122S/M157K	28.5
797	R35N/H37T/R37aY/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	28.7
984	R37aH/V38E/T39Y/V41R/T56A/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158A	28.8
515	F30H/R35Q/H37T/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	28.9
503	F30H/R36L/V38E/V41R/K82R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	29
370	V38D/V41R/H99Q/C122S/Y151L/R217V	29.1
736	R35Q/H37G/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	29.2
726	F30Y/R35Q/R36H/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aE/Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	29.3

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
704	R35Q/H37Y/R37aD/V38E/T39L/V41R/D60aE/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	29.4
657	F30Y/R35L/R36H/H37E/V38E/T39N/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	29.6
963	R36S/V38E/Y40L/V41N/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217T	29.6
401	T39W/V41R/L97bG/H99Q/C122S	29.7
9	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	29.8
28	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	29.8
940	R35S/R37aA/V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y149V	30.2
612	F30Y/R35W/R36H/H37Q/V38E/T39H/Y40H/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	30.3
715	F30Y/R35Q/R36H/H37Y/R37aD/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bV/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	30.4
171	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/Y151L/M157K	30.6
511	F30H/R35H/H37I/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149W/Y151L/M157K/R217S	30.6
875	V38D/T39Y/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	30.7
702	R35F/H37D/R37aN/V38E/T39Y/V41R/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	30.9
402	T39Y/V41R/Y60bQ/L97bG/H99Q/C122S	31.1
398	T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S	31.4
881	V38D/V41R/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217E	31.5
924	R36S/V38D/T39L/Y40L/V41R/L97bI/H99E/C122S/R217T	31.5
936	R35S/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/Y60bV/T97aL/L97bA/H99Q/C122S/Y149L	31.5
350	Y40Q/V41L/Y60bT/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	31.6
496	F30Y/V38E/Y40H/V41R/T56A/L97bA/H99Q/C122S/M157K/K243M	31.9
231	F30Y/R36H/R37aH/V38E/Y40H/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	31.9
516	F30H/R35Q/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	32
818	V38D/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	32
324	H37G/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	32.1
948	R35S/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	32.2
368	R35V/R37aE/V38E/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S	32.2
351	Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	32.5
551	F30Y/R35H/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/I138V/M157K	33.1
43	T39Y/V41R/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S	33.2
696	F30Y/R35H/R36H/H37D/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60b	33.4

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
	D/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	
495	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A	33.5
972	V38E/T39W/V41R/D60aP/Y60bD/L97bA/H99L/C122S	33.5
242	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/I65T/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	33.6
884	V38D/V41R/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217V	33.7
801	R35Q/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	33.8
673	R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	34
958	R36S/V38E/Y40Q/V41R/L97bG/H99L/C122S/Y151P/R217E	34.3
15	V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	34.5
340	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E	34.5
339	H37G/R37aD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E	34.8
282	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/K187S/K223S/K224Y	34.9
39	Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S	35.2
504	F30H/R35H/V38D/V41R/K61E/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K/R206H	35.4
8	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	35.7
273	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	35.7
943	R35A/R37aE/V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	35.9
827	V38D/V41L/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217Q	36.2
517	F30H/R35Q/H37W/V38D/V41R/D60aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/Y151L/M157K/R217D	36.4
620	F30Y/R35F/R36H/H37G/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bS/T97aD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	36.7
399	T39Y/V41R/L97bG/H99Q/C122S	36.8
608	F30Y/R35I/R36H/H37E/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bS/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	36.9
934	R35S/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	37.2
387	Y40H/V41Q/L97bG/H99Q/C122S/R217T	37.2
645	R35W/H37D/V38D/T39Y/V41R/Y60bS/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	37.4
869	V38D/T39F/Y40L/V41R/T97aW/L97bA/H99Q/C122S	37.8
878	V38D/T39Y/Y40L/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S	37.8
718	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39F/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	38.2
873	V38D/T39L/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	38.2
876	V38D/T39Y/Y40L/V41R/T97aW/L97bA/H99Q/C122S	38.4

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
550	F30Y/R36H/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99L/C122S/F141L/M157K/T158A	38.5
728	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aA/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	38.5
712	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	38.6
404	T39Y/V41R/Y60bP/L97bG/H99Q/C122S	39.2
507	F30H/R36H/V38D/V41R/T56A/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	40
720	F30Y/R35E/R36H/H37D/R37aN/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	40
268	V38E/Y40Q/V41L/D60aP/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S/Y149W	40.4
498	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	40.5
509	F30H/R35Q/H37W/V38D/V41R/D60aE/Y60bS/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/Y151L/M157K	40.8
742	R35Q/H37G/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	40.9
686	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151P/M157K/Q192H	41
710	F30Y/R35M/R36H/H37D/R37aD/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	41.2
618	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bT/T97aD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	41.3
872	V38D/T39L/Y40L/V41R/T97aV/L97bA/H99Q/C122S	41.6
822	V38D/V41R/Y60bS/T97aI/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192F/R217E/K224R	42.1
403	T39Y/V41R/Y60bP/L97bA/H99Q/C122S	42.1
446	R36H/V38D/Y40F/V41R/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L/Q192E/R217D	42.2
735	R35M/H37G/R37aD/V38E/T39W/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	42.3
543	F30Y/V38D/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K/Q192H	42.4
475	F30H/V38D/Y40F/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157F	42.5
697	H37M/R37aD/V38E/T39A/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	42.7
171	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/Y151L/M157K	42.8
552	T22I/F30Y/R35S/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/I138V/M157K	42.9
734	R35L/H37D/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	42.9
561	F30Y/R35L/V38D/Y40H/V41R/N76S/L97bA/H99Q/C122S/M157K/K187E	43.6
481	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157S	43.8
648	R35W/H37D/V38D/T39Y/V41R/Y60bH/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	44.2

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
595	F30Y/R36H/H37G/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149Q/M157K	44.6
904	R35Q/H37G/R37aE/V38W/T39Y/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	44.6
330	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	44.6
879	V38D/T39Y/Y40M/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S	45
647	R35Q/H37N/V38D/T39Y/V41R/Y60bP/L97bA/H99Q/C122S	45.4
663	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	45.8
23	R35Q/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	46.1
975	V38E/T39L/V41R/D60aN/Y60bP/L97bG/H99Q/C122S	46.8
601	F30Y/R36H/H37A/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	46.9
722	F30Y/R35W/R36H/H37E/R37aP/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149Q/M157K	47.7
748	H37T/R37aL/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192R	47.9
325	H37G/R37aD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	47.9
667	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/Y40H/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	48.6
868	V38D/T39W/Y40L/V41R/T97aL/L97bA/H99Q/C122S	48.9
326	H37G/R37aD/G37bD/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	49
42	T39Y/V41R/L97bA/H99Q/C122S	49
874	V38D/T39L/Y40L/V41R/T97aW/L97bA/H99Q/C122S	49.1
584	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149N/L150V/M157K	49.3
534	R35S/V38D/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157Y	49.8
925	R37aS/V38D/T39Y/Y40F/V41R/H99L/C122S/R217T	49.9
349	Y40Q/V41L/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	49.9
390	Y40H/V41T/L97bG/H99Q/C122S/R217T	50
506	F30H/R35S/V38E/V41R/Y60bH/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	50.1
877	V38D/T39Y/Y40M/V41R/T97aW/L97bA/H99Q/C122S	50.1
900	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	50.9
737	R35A/H37G/R37aE/V38E/T39F/V41R/D60aE/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	51.1
22	H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	51.1
598	F30Y/R36H/H37N/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aV/L97bA/H99	51.4

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
	Q/C122S/Y149L/M157K	
545	F30Y/V38D/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157A/Q192Y	51.5
954	V38E/Y40H/V41Q/L97bG/H99Q/C122S/R217T	51.6
870	V38D/T39Y/Y40Q/V41L/T97aY/L97bA/H99Q/C122S	51.7
942	R35V/R37aE/V38E/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	51.7
358	R35S/Y40Q/V41L/Y60bT/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	52.4
535	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157T	52.9
356	R35K/Y40Q/V41L/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	53.2
692	F30Y/R35V/R36H/H37T/V38E/T39A/Y40L/V41Q/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	53.7
184	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K/R217D	54
249	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/I65T/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	54.1
672	R36H/H37S/V38E/T39W/V41R/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	54.1
371	V38D/V41R/L97bR/C122S/Y151L/R217V	54.3
553	F30Y/R36S/V38D/T39I/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/S146P/M157K/T158S	54.6
365	R35V/R37aE/V38E/Y40Q/V41L/Y60bS/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	54.6
37	V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/H99Q/C122S	54.9
347	R37aE/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S	54.9
709	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39F/Y40F/V41R/D60aS/Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	55.3
487	F30H/G37bD/V38D/T39H/V41R/L97bA/H99Q/R110dH/C122S/Y151L/M157K/S240I	55.5
902	R35K/H37A/R37aE/V38H/T39Y/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	55.9
603	F30Y/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bN/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	56
25	R35Q/H37Y/R37aE/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	56.2
436	V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L/Q192E/R217D	56.3
606	F30Y/R36H/H37E/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bN/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	56.4
337	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E	56.4
587	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K/K187R	57.7
232	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	58
44	T39Y/V41R/D60aP/L97bA/H99Q/C122S	58.2

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
329	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	58.5
216	I17V/F30Y/R35Q/H37W/V38D/Y40H/V41R/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K	58.6
519	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149W/M157K/R217D	58.8
270	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/M157K	59.3
348	R37aE/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	59.3
793	R35N/H37S/R37aE/V38E/T39F/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	59.5
226	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	59.9
719	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aL/V38E/T39N/Y40F/V41R/D60aP/Y60bT/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	59.9
625	F30Y/R35V/R36H/H37G/V38E/T39L/Y40H/V41R/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192T/R239H	60.1
903	R35Q/H37G/R37aE/V38Y/T39F/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	60.1
35	V38E/Y40Q/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	60.2
176	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149N/Y151L/M157K	60.3
381	H99Q/C122S/Y151L/R217V	60.4
841	R35S/V38D/Y40H/V41L/Y60bD/L97bG/H99Q/C122S	61.5
698	R35F/H37D/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aE/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	63.4
935	R35V/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/Y60bG/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	63.5
951	R36L/V38E/Y40Q/V41R/L97bG/H99Q/C122S/Y151P/R217S	63.7
600	F30Y/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bV/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	63.9
607	F30Y/R36H/H37G/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aA/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	64.2
947	R37aD/V38E/Y40Q/V41L/Y60bP/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149K	64.8
555	F30Y/R35L/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	65.1
357	R37aD/Y40Q/V41L/Y60bT/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	65.3
699	R35A/H37D/R37aN/V38E/T39F/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	65.8
198	I17V/F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	66
267	V38E/Y40Q/V41Q/D60aP/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S/Y149W	66
711	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aN/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	66.2
849	V38D/V41R/Y60bR/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	66.2
518	F30H/R35Q/V38D/V41R/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149N/Y151L/M	66.3

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
	157K	
313	V38D/T39L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	66.3
937	R37aP/V38E/Y40Q/V41L/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	67.2
591	F30Y/R36H/H37S/V38E/T39L/Y40H/V41R/Y60bH/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	67.5
901	R35Q/H37G/R37aE/V38Y/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	67.6
955	V38E/Y40H/V41T/L97bG/H99Q/C122S/R217T	67.8
833	V38D/V41Q/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217T	68.6
417	V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/R217D	68.8
695	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39I/Y40F/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149M/M157K	69.2
893	R35G/H37T/R37aE/V38T/T39Y/V41Q/Y60bR/T97aF/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	69.7
932	R37aS/V38D/T39Y/V41R/L97bI/H99E/C122S/R217T	70.1
233	F30Y/R36H/R37aH/V38E/Y40H/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	70.3
661	F30H/R35L/R36H/H37E/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	70.4
629	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192M	70.8
807	V38E/T39L/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149V/Y151L/Q192T	71.1
199	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149W/M157K	71.3
725	F30Y/R35F/R36H/H37D/R37aD/V38E/T39H/Y40F/V41R/D60aP/Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	71.3
565	F30H/R35Q/H37Y/V38D/V41R/D60aE/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157K	71.4
376	L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217V	72.3
960	R37aS/V38E/Y40H/V41T/L97bG/H99Q/C122S/R217T	72.6
307	Y40Q/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	73
466	R36H/G37cD/V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/M157T/R217D	75
839	R35K/V38D/Y40H/V41R/Y60bS/L97bG/H99Q/C122S	75.6
299	R35Q/H37Y/R37aE/V38D/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	77.3
592	F30Y/R35L/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bA/T97aD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	77.9
520	F30Y/R35Q/H37W/V38D/Y40H/V41R/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K	78.3
389	Y40H/V41Q/L97bG/H99Q/C122S	78.4
400	T39H/V41R/L97bG/H99Q/C122S	78.4
315	V38D/T39L/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S	79

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
740	R35Q/H37G/R37aE/V38E/T39H/V41R/D60aP/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	80.1
716	F30Y/R35A/R36H/H37T/R37aD/V38E/T39Y/Y40L/V41R/D60aP/Y60bE/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	80.7
700	R35Q/H37D/R37aA/V38E/T39F/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	80.7
312	V38D/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	80.7
651	F30Y/R35L/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192N	80.9
871	R37aS/V38D/T39Y/Y40M/V41R/T97aL/L97bA/H99Q/C122S	81.2
374	R35V/R37aE/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	81.4
359	R37aE/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	81.5
938	R35M/R37aQ/V38E/Y40Q/V41L/Y60bE/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	81.6
38	V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/C122S	82.9
243	F30Y/R36H/V38E/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	83.5
500	F30Y/R35H/V38D/T39S/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S/T147S/M157K	84.7
564	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K/Q192H/R239H	85.7
721	F30Y/R36H/H37M/R37aD/V38E/T39G/Y40F/V41R/D60aP/Y60bE/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	85.9
523	F30Y/R35H/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	87.3
544	F30Y/V38D/Y40L/V41Q/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157R/Q192Y	88.1
228	F30Y/R35Q/H37W/V38D/Y40H/V41R/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	88.8
826	V38D/V41Q/Y60bR/T97aW/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	90
985	R37aH/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S	90.7
547	F30H/V38D/V41Q/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157R	91.3
886	V38D/T39Y/Y40L/V41K/L97bR/H99L/C122S/E175D	91.8
944	R37aD/V38E/Y40Q/V41L/Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	91.9
32	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/C122S/Y149R	92.3
542	N26D/F30Y/V38D/Y40H/V41R/I65T/L97bA/H99Q/C122S/M126I/M157K	93.2
946	R35A/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/Y60bV/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K	93.4
939	R35S/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/Y60bT/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	93.5
508	F30H/R35Q/H37T/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149I/Y151L/M157K/R217D	93.6
541	F30H/V38D/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	94.2
377	V38D/H99Q/C122S/Y151L/R217V	94.4

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
576	F30Y/R35T/H37T/V38D/Y40H/V41R/D60aP/Y60bD/L97bA/H99Q/C122S/Y149T/M157K	94.7
227	I17V/F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	94.8
855	V38D/V41R/Y60bR/L97bR/H99L/C122S/Y151L/E175D/Q192Y/R217E/K224R	94.9
372	R37aE/V38E/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	95
594	F30Y/R36H/H37E/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	96.3
820	V38D/V41Q/D60aP/Y60bS/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192Y/R217E/K224R	96.4
510	F30H/R35Q/H37Q/V38D/V41R/A96D/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/Y151L/M157K/R217D	96.8
240	F30Y/R35Q/H37Y/V38D/Y40H/V41R/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	98.7
891	H37A/R37aE/V38F/T39L/V41Q/Y60bR/T97aW/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	99.6
605	F30Y/R36H/V38E/T39V/Y40H/V41R/Y60bH/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149S/M157K	99.7
485	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S	99.9
622	F30Y/R35V/R36H/H37S/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192T	100
585	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/Y60bN/N87D/A96T/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/N145S/M157K/M207K	101
309	V38E/Y40Q/V41L/L97bA/C122S	101
952	R37aS/V38E/V41R/L97bG/H99Q/C122S/R217V	101
445	R36H/V38D/Y40L/V41K/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L/Q192T/R217D	102
649	F30Y/R35Q/R36H/H37G/V38E/T39H/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192M	102
363	R35V/R37aE/Y40Q/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	103
314	V38D/T39L/Y40L/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	104
183	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/R217E	105
655	F30L/R35L/R36H/H37D/V38E/T39Y/V41K/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	105
921	R36S/V38D/T39A/Y40F/V41R/L97bA/H99E/C122S/R217T	105
568	F30Y/R35K/H37E/V38D/Y40H/V41R/D60aP/Y60bD/L97bA/H99Q/C122S/Y149N/M157K	106
691	F30Y/R35L/R36H/H37E/V38E/T39S/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	106
739	R35Q/H37T/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aE/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	106
448	R36H/V38D/Y40I/V41K/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Q192A/R217D	107

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
540	F30Y/R36H/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T210S	107
397	T39Y/V41R/Y60bQ/L97bA/C122S	108
208	F30Y/R35Q/H37T/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149W/M157K	109
211	F30Y/V38D/Y40H/V41R/T56A/L97bA/H99Q/C122S/M157K	109
546	F30Y/R36S/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	109
850	V38D/V41R/D60aP/Y60bD/T97aW/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/E175D/Q192A/R217E/K224R	109
842	V38D/V41R/Y60bN/T97aL/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	109
883	R35H/V38D/V41Q/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217V	109
967	R35H/V38E/L97bR/C122S/Y151L/R217V	109
447	R36H/V38D/V41R/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L/Q192G/R217D	110
254	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bH/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192A	111
385	R37aS/V41R/L97bG/H99Q/C122S/R217V	111
887	R35Q/H37G/R37aN/V38F/T39H/V41Q/Y60bR/T97aL/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	112
164	R36S/V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/M157K/R217D	113
210	F30Y/R35Q/H37T/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	113
838	R35S/V38D/Y40Q/V41R/Y60bS/L97bG/H99Q/C122S	113
898	H37S/R37aD/V38H/T39L/V41Q/Y60bR/T97aW/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	113
196	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149F/M157K	114
310	Y40Q/L97bA/H99Q/C122S	114
355	R37aE/Y40Q/V41L/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	114
945	R35S/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/T97aD/L97bA/H99Q/C122S/Y149K	115
643	R35Q/H37M/V38D/T39V/V41R/Y60bP/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	116
644	R35L/H37E/V38D/T39Y/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	116
450	R36H/V38D/Y40L/V41R/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L/Q192D/R217D	118
497	F30Y/Y34N/V38D/Y40H/V41R/Y94F/S95R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T242I	118
323	R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	118
334	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/Q192T/R217E/K224R	118
392	Y40H/V41T/L97bG/H99Q/C122S	118
8	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	119
434	R37aH/V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/	119

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
	Y151L/Q192G/R217D	
419	R36H/V38D/V41M/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/R217D	120
317	V38D/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217V	120
201	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149W/M157K	121
549	F30Y/R37aH/V38D/Y40H/V41R/K61E/L97bA/H99Q/C122S/M157K	121
767	V38D/L97bR/H99E/C122S/E175D/K224S	121
888	H37N/R37aD/V38Y/T39F/V41Q/Y60bR/T97aW/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	121
452	R36H/V38D/Y40L/V41R/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L/Q192R/R217D	122
560	F30Y/R37aS/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	122
837	V38D/V41R/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/Q192S/R217A	122
361	R37aD/Y40Q/V41L/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	122
880	R35S/V38D/V41T/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217E	124
40	Y40Q/V41L/L97bA/C122S	124
173	F30H/V38D/V41R/L97bV/H99Q/C122S/Y151L/M157K	125
229	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	125
322	V38D/V41R/L97bR/H99Q/C122S/Y151L	125
895	H37A/R37aE/V38Y/T39Y/V41Q/Y60bR/T97aV/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	126
892	H37N/R37aE/V38F/T39L/V41Q/Y60bR/T97aW/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	127
652	F30Y/R35L/R36H/H37E/V38E/T39L/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192H	129
451	R36H/V38D/Y40L/V41R/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151M/Q192T/R217D	130
854	V38D/V41R/Y60bR/L97bR/H99L/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	130
308	V38E/Y40Q/L97bA/H99Q/C122S	133
968	V38E/T56I/H99Q/C122S/Y151L/S190G/R217V	134
556	F30Y/S37dP/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	135
964	R35S/V38E/L97bR/C122S/Y151L/R217V/H241N	135
396	T39Y/V41R/L97bA/C122S	135
384	L97bR/C122S/Y151L/R217V	136
599	F30Y/R35L/R36H/H37E/V38E/T39L/Y40H/V41R/Y60bS/T97aD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	137
596	F30Y/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bD/T97aD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	137
894	R35K/H37S/R37aE/V38F/T39Y/V41Q/Y60bR/T97aL/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	141
269	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99L/C122S/Y149K/M157K	142

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
840	R35Q/V38D/Y40L/V41L/Y60bP/L97bG/H99Q/C122S	142
471	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157E	146
429	V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L/Q192D/R217D	146
501	F30Y/R36S/V38H/Y40L/V41R/N76K/L97bA/H99Q/C122S/M157K	146
195	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	147
539	F30H/V38D/Y40F/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157R/Q192H	149
927	R37aP/V38D/T39L/Y40I/V41R/H99L/C122S/R217Q	150
293	V38E/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	152
375	R35V/R37aE/V38E/Y40Q/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	153
214	V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A	154
189	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149F/M157K/R217E	155
31	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/H99Q/C122S/Y149R	155
393	V41R/L97bG/H99Q/C122S	155
890	R35K/H37G/R37aE/G37bS/V38F/T39H/V41Q/Y60bR/T97aW/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	156
571	F30Y/R35S/H37G/V38D/Y40H/V41R/D60aP/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	158
602	F30Y/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bM/T97aD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	159
203	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	160
843	V38D/V41Q/Y60bR/T97aF/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/E175D/Q192H/R217E/K224R	160
897	H37A/R37aD/V38Y/T39Y/V41Q/Y60bR/T97aD/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	160
896	H37D/R37aD/V38Y/T39Y/V41Q/Y60bR/T97aL/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	162
353	Y40Q/V41L/L97bA/C122S/Y149R	162
488	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149N/Y151L/M157K/R239H	163
930	R36S/V38D/T39S/V41R/L97bI/H99E/C122S/R217T	163
906	V38D/T39V/V41R/L97bV/H99E/C122S/R217E	165
962	R37aS/V38E/Y40Q/V41L/L97bG/C122S/Y151P/R217T	166
484	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	167
378	V38D/L97bR/C122S/Y151L/R217V	170
593	F30Y/R36H/H37P/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	171
825	V38D/V41K/D60aN/Y60bN/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192H/R217E/K224R	172
889	H37A/R37aE/V38F/T39L/V41Q/Y60bR/T97aF/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	174
345	Y40Q/V41L/H99Q/C122S	174

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
574	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/Y60bS/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/R217E	175
730	F30Y/R36H/H37D/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	176
941	R35K/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	178
209	F30Y/R35Q/H37T/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149F/M157K	179
321	V38D/T39L/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/C122S	179
245	N26D/F30Y/R36H/R37aH/V38E/Y40H/V41R/K61E/I65T/L97bA/H99Q/C122S/M126I/M157K	185
367	R35V/R37aE/V38E/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/C122S/Y149R	185
483	F30Y/V38D/Y40M/V41R/L97bA/H99Q/C122S	188
768	V38D/L97bV/H99E/C122S/K224S	192
861	V38D/V41R/D60aQ/Y60bP/L97bG/H99Q/C122S	192
202	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149F/M157K	194
931	R37aS/V38D/T39G/V41R/L97bM/H99E/C122S/R217S	194
521	F30Y/R35Q/H37T/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149I/M157K	196
473	F30Y/V38D/Y40H/V41A/L97bA/H99Q/C122S/M157R	197
191	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K/R217E	199
206	F30Y/H37T/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	199
327	H37G/R37aD/G37bD/V38F/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	199
41	R37aS/V41R/L97bG/H99Q/C122S	199
244	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K/Q192H	201
248	N26D/F30Y/V38D/Y40H/V41R/I65T/L97bA/H99Q/C122S/M126I/Y149R/M157K	201
864	R35K/V38D/Y40H/Y60bP/L97bG/H99Q/C122S	201
525	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/E153D/M157K	202
526	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/D148N/M157K/T188S	202
660	R35E/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192T	202
558	F30Y/R37aS/V38D/Y40H/V41R/E86D/L97bA/H99Q/C122S/M157K/F234Y	203
723	F30Y/R35Q/R36H/H37D/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aE/Y60bG/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	203
563	F30Y/R37aS/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/K187Q/T208S	205
465	R36H/V38D/V41R/A96D/D97G/T97aN/A98G/L97bdel/H99L/C122S/Q192R/R217F	208
170	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/R217D	208

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
583	F30Y/R35T/H37T/V38D/Y40H/V41R/D60aT/Y60bS/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	208
609	F30Y/R35L/H37D/V38D/Y40H/V41R/D60aE/Y60bT/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	212
352	R37aE/Y40Q/V41L/L97bA/C122S	212
920	R36S/V38D/T39K/Y40F/V41R/L97bI/H99E/C122S/R217S	213
320	V38D/T39L/Y40L/V41K/L97bR/H99L/C122S/E175D	215
169	V38D/V41R/A96E/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L/T178S/Q192E/R217D	217
588	F30Y/R37aP/V38D/Y40H/V41R/Y60bN/E84D/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T242I	219
190	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149F/M157K/R217D	222
566	F30Y/R35T/H37Q/V38D/Y40H/V41R/D60aE/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	230
536	R37aL/V38D/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157S	231
760	V38D/L97bR/H99E/C122S/E175D/R217E/K224R	234
478	F30Y/V38D/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157R	235
238	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/D60aE/Y60bS/L97bA/H99Q/C122S/Y149T/M157K	235
234	F30Y/R35Q/H37D/V38D/Y40H/V41R/D60aE/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149S/M157K	236
207	F30Y/R35Q/H37T/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	238
344	Y40Q/V41L/C122S	238
554	F30Y/Y34S/R37aH/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149F/M157K	239
354	R37aE/Y40Q/V41L/L97bA/C122S/Y149R	245
247	N26D/F30Y/V38D/Y40L/V41R/I65T/L97bA/H99Q/C122S/M126I/M157K	247
476	F30Y/V38D/Y40H/V41N/L97bA/H99Q/C122S	250
524	F30Y/R35H/V38D/Y40H/V41R/T56A/L97bV/H99Q/R116S/C122S/M157K/T210N	250
212	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151F/M157K	252
388	Y40H/V41Q/L97bG/C122S/R217T	252
974	V38E/T39H/D60aP/Y60bK/L97bG/H99Q/C122S	252
205	F30Y/H37T/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149F/M157K	255
167	V38D/Y40P/V41K/L97bA/H99Q/C122S	257
573	F30Y/R35T/H37A/V38D/Y40H/V41R/D60aP/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K/R217Y	263
559	F30Y/R37aH/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/S174P	267
569	F30Y/R35L/H37D/V38D/Y40H/V41R/Y60bD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	267

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
578	F30Y/R35S/V38D/Y40H/V41R/D60aE/Y60bS/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	270
383	L97bR/H99Q/C122S/Y151L	271
572	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/D60aE/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149N/M157K	275
200	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	276
250	F30Y/V38D/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	277
567	F30Y/R35T/V38D/Y40H/V41R/D60aE/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/R217K	277
477	F30S/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	279
819	V38D/V41Q/D60aK/Y60bD/T97aA/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192Y/R217E/K224R	279
186	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K/R217E	280
976	V38E/T39H/D60aP/Y60bW/L97bG/H99Q/C122S	281
662	F30H/R35L/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/V41Q/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	284
316	V38D/T39L/Y40L/V41R/T97aI/H99Q/C122S	284
757	V38D/L97bR/H99Q/C122S/E175D/R217E/K224R	292
923	R37aS/V38D/T39L/Y40L/V41R/L97bM/H99L/C122S/R217S	292
654	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192Y	297
637	R35E/H37D/V38D/T39N/V41R/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	306
766	V38D/L97bR/H99E/C122S/E175D/K224A	306
763	V38D/L97bV/H99L/C122S/E175D/K224S	310
813	V38D/L97bR/H99L/C122S/E175D/K224A	310
912	R37aP/V38D/T39Y/V41R/L97bV/H99Q/C122S/R217T	316
175	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151M/M157K	321
502	F30H/V38D/V41R/L73Q/L97bA/H99Q/E110bD/C122S/Y149N/Y151L/M157K	321
582	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/D60aE/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	324
817	V38D/L97bT/H99E/C122S/E175D/K224S	326
204	F30Y/H37T/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	330
522	F30Y/R35Q/H37T/V38D/Y40H/V41R/D60aE/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K	331
589	F30Y/R37aP/G37bD/V38D/Y40H/V41R/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/M157K	331
237	F30Y/R35Q/V38Y/Y40H/V41R/D60aE/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149V/M157K/R217M	332
764	V38D/L97bR/H99L/C122S/E175D/R217E	333
235	F30Y/R35Q/H37T/V38D/Y40H/V41R/D60aE/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	338

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
773	V38D/L97bG/H99Q/C122S/R217Q	338
187	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K/R217D	341
933	R35E/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	342
610	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/D60aK/Y60bV/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	344
581	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/D60aP/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/R217K	345
865	R35Q/V38D/Y40M/V41R/Y60bA/L97bG/H99Q/C122S	345
252	F30Y/R36H/V38E/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K/Q192H	346
331	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	347
26	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	348
866	R35K/V38D/Y40F/V41R/Y60bT/L97bG/H99Q/C122S	348
579	F30Y/R35H/H37T/V38D/Y40H/V41R/D60aR/Y60bD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	349
774	F30H/V38D/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157T/Q192H	349
380	L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217V	351
860	R35S/V38D/V41L/D60aP/Y60bW/L97bG/H99Q/C122S	353
391	Y40H/V41T/L97bG/C122S/R217T	357
301	V38E/V41L/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	364
815	V38D/L97bK/H99L/C122S/E175D/K224A	365
302	L97bG/H99Q/C122S/R217Q	367
646	R35G/H37G/V38D/T39W/V41A/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S	370
636	R35F/H37G/V38D/T39H/V41A/Y60bD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	371
332	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	371
193	F30Y/H37D/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K/R217E	378
862	R35Q/V38D/Y40H/V41L/Y60bD/L97bG/H99Q/C122S	380
828	V38D/V41Q/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/Q192S/R217A	385
965	R35S/V38E/H99Q/C122S/S146F/Y151L/V159L/K179N/Q192R/R217V/T242S	408
590	F30Y/R35L/R36H/H37P/V38E/Y40H/V41R/Y60bG/T97aD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	409
971	V38E/T39R/D60aP/Y60bD/L97bG/H99Q/C122S	412
846	R37aS/V38D/V41R/Y60bT/T97aD/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/E175D/Q192A/R217E/K224R	413
318	V38D/V41R/L97bR/H99Q/C122S/R217V	418
438	R36H/V38D/Y40F/V41R/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L/Q192D/R217D	421

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
537	F30N/V38D/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157R	428
899	H37G/R37aD/V38Y/T39H/V41Q/Y60bR/T97aD/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	433
659	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39S/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192A	434
844	V38D/V41R/D60aP/Y60bD/T97aP/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/E175D/Q192R/R217E/K224R	437
460	F30Y/R36H/V38D/V41K/D97E/T97adel/A98G/L97bdel/H99L/C122S/R217D	445
274	L97bA/H99Q/C122S	449
966	F30Y/R37aH/V38E/H99Q/C122S/Y151L/R217V	449
246	N26D/F30Y/V38D/Y40H/V41R/I65T/L97bA/H99Q/C122S/M126I/M157K/Q192H	455
253	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39S/Y40H/V41W/Y60bW/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192Y	463
970	V38E/T39S/V41L/Y60bP/L97bG/H99Q/C122S	464
319	V38D/Y40L/V41K/L97bR/H99L/C122S/E175D	466
236	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149Q/M157K/R217S	470
297	V38D/L97bR/H99E/C122S/E175D/R217E	470
343	V41L/L97bA/H99Q/C122S	471
366	R35V/R37aE/V38E/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/H99Q/C122S/Y149R	478
640	R35F/H37E/V38D/T39S/V41A/Y60bD/L97bA/H99Q/C122S	487
333	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/E175D/Q192T/R217E/K224R	499
213	V38D/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A	503
256	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39R/Y40H/V41W/Y60bW/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192Y	511
529	F30H/V38D/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157L/Q192H	515
492	F30Y/R37aH/V38D/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	516
239	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/D60aE/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K/R217S	530
814	V38D/L97bM/H99S/C122S/K224S	538
575	F30Y/R37aD/V38D/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M126K/M157K	539
394	V41Q/L97bG/H99Q/C122S	547
435	V38D/Y40P/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Q192L/R217D	557
258	F30Y/R35Y/R36H/H37E/V38E/T39R/Y40H/V41W/Y60bW/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192H	569
908	R36S/V38D/T39H/Y40L/V41R/L97bV/H99V/C122S/R217Q	574
638	R35Q/H37Y/V38D/T39A/V41R/Y60bP/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Q192S	575

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
845	V38D/V41Q/Y60bP/T97aW/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/E175D/Q192K/R217E/K224R	578
907	R37aH/V38D/T39M/Y40A/V41K/L97bR/H99Q/C122S/R217E	582
328	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	594
811	V38D/L97bR/H99L/C122S/E175D/R217E/K224R	610
848	R37aS/V38D/V41R/D60aS/Y60bP/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/E175D/Q192R/R217E/K224R	614
570	F30Y/R35H/H37T/V38D/Y40H/V41R/D60aE/Y60bD/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K/R217K	622
295	V38E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	630
499	F30Y/R35H/V38D/T39S/Y40H/V41R/S75P/L97bA/H99Q/C122S/M157K/I163M/Q204H/K243E	632
528	F30Y/V38D/Y40M/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157R/Q192M	641
395	V41T/L97bG/H99Q/C122S	646
463	R36H/V38D/V41M/A55S/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/R217D	647
928	V38D/T39V/Y40L/V41S/H99V/C122S/R217V	653
577	F30Y/R35H/H37D/V38D/Y40H/V41R/D60aK/Y60bS/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	659
759	V38D/L97bR/H99L/C122S/E175D/R217E/K224S	661
769	V38D/L97bK/H99L/C122S/R217E	673
174	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151F/M157K	688
867	R35Q/V38D/Y40F/V41T/Y60bP/L97bG/H99Q/C122S	698
462	R36H/V38D/V41M/F59I/D97E/T97adel/A98G/L97bdel/H99L/C122S/R217D	702
969	F30Y/V38E/L97bR/C122S/Y151L/R217V	702
914	V38D/T39H/Y40F/V41K/L97bM/H99T/C122S/R217E	717
386	R37aS/V41R/L97bG/C122S/R217V	726
379	V38D/L97bR/H99Q/C122S/R217V	731
885	R37aS/V38D/V41R/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/Q192T/R217V	738
27	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	743
362	R35V/R37aE/V38E/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	765
241	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/Q192H	778
527	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/K223N/P236S	781
255	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39Q/Y40H/V41W/Y60bW/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192F	802
490	F30Y/R37aH/V38D/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/R110dH/C122S/M157K/V160I	808
630	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39V/Y40H/V41W/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192H	819

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
771	V38D/L97bV/H99L/C122S/K224A	824
444	R36H/V38D/Y40F/V41R/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151M/Q192D/R217D	825
479	F30Y/R36H/V38D/Y40F/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151M/M157Y/Q192A	830
812	V38D/L97bT/H99L/C122S/E175D/R217K	851
294	V38E/T97aE/L97bA/H99Q/C122S	862
580	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/D60aE/Y60bK/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/R217I	917
816	V38D/L97bR/H99V/C122S/E175D/R217E/K224R	930
853	V38D/V41Q/Y60bP/T97aY/L97bR/H99L/C122S/Y151L/E175D/Q192K/R217E/K224R	960
922	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/L97bG/H99S/C122S	989
852	V38D/V41Q/D60aN/Y60bP/T97aN/L97bR/H99I/C122S/Y151L/E175D/Q192R/R217E/K224R	993
635	R35Q/H37D/V38D/T39H/V41R/Y60bP/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Q192T	998
548	F30H/V38D/L97bA/H99Q/C122S/Y151F/M157K	1000
259	F30Y/R35Y/R36H/H37E/V38E/T39R/Y40H/V41W/Y60bW/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192F	1030
847	V38D/V41K/D60aE/Y60bP/T97aA/L97bR/H99L/C122S/Y151L/E175D/Q192R/R217E/K224R	1040
851	V38D/V41Q/D60aN/Y60bP/L97bR/H99L/C122S/Y151L/E175D/Q192R/R217E/K224R	1040
336	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/K224R	1040
639	R35Q/H37Y/V38D/T39F/V41R/Y60bP/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Q192G	1130
215	F30Y/R37aH/V38D/Y40Q/V41I/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157W/Q192Y	1140
631	F30Y/R35Y/R36H/H37E/V38E/T39A/Y40H/V41W/Y60bV/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192H	1170
859	R36H/V38D/T97aR/L97bG/H99Q/C122S/E175F	1180
177	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149N/Y151F/M157K	1190
305	V38D/L97bG/H99Q/C122S	1190
909	R36S/V38D/T39K/Y40F/V41R/L97bN/H99E/C122S/R217S	1230
251	F30Y/V38D/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/Q192H	1240
423	V38D/L97bA/H99Q/C122S	1310
916	V38D/T39L/Y40L/V41K/L97bH/H99L/C122S/R217A	1320
642	R35Q/H37G/V38D/T39W/V41R/Y60bP/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Q192G	1340
929	R37aS/V38D/T39V/V41E/L97bG/H99Q/C122S/R217T	1390
626	F30Y/R35Y/R36H/H37E/V38E/T39L/Y40H/V41W/Y60bE/T97aI/L97bA	1450

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
	/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192F	
863	R37aS/V38D/V41R/D60aT/Y60bN/L97bG/H99Q/C122S	1450
805	V38E/T39W/V41T/D60aP/Y60bW/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/Y151G/Q192T	1480
770	V38D/L97bR/H99L/C122S/E175D/R217T/K224S	1570
808	V38D/L97bR/H99M/C122S/E175D/R217E	1570
424	R36S/V38D/L97bR/H99E/C122S/R217D/K224R	1580
432	R36H/V38D/V41R/A96D/D97G/T97adel/A98G/L97bdel/H99L/C122S/Y151F/Q192D/R217D	1600
809	V38D/L97bR/H99M/C122S/E175D/R217E/K224R	1660
634	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39V/Y40H/V41W/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192A	1760
197	I17L/F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	1790
632	F30Y/R35Y/R36H/H37P/V38E/T39R/Y40H/V41W/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K/Q192F	1900
810	V38D/L97bR/C122S/E175D/R217E/K224R	1990
761	V38D/L97bR/H99E/C122S/E175D/R217S/K224S	2040
532	F30H/V38D/Y40H/V41Q/L97bA/H99Q/C122S/Q192H	2110
482	F30Y/V38D/Y40H/V41K/L97bA/H99Q/C122S/Y151R/M157R	2190
491	F30Y/A32E/Y34N/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	2210
422	A32S/V38D/H99E/C122S/K224A	2230
493	F30Y/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	2240
762	V38D/L97bR/H99V/C122S/E175D/R217E/K224N	2240
533	F30Q/V38D/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151H/M157R/Q192Y	2300
179	F30H/V38D/V41R/L97bV/H99Q/C122S/Y151F/M157K	2390
772	V38D/L97bR/H99V/C122S/E175D/R217E/K224S	2490
756	V38D/L97bR/H99E/C122S/Y172F/E175D/R217E	2720
154	V38D/T97adel/L97bdel/C122S	2950
180	F30H/V38D/V41R/L97bV/H99Q/C122S/Y149N/Y151F/M157K	3230
765	V38D/L97bG/H99Q/C122S/E175D/R217K/K224A	3310
5	C122S	3380
192	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K/R217G	3860
461	R36H/V38D/V41K/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/V213A/R217D	4030
182	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/R217G	4210
489	F30Y/A32E/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	4280
172	F30Y/V38D/V41R/L97bV/H99Q/C122S/Y151F/M157K	5890
178	F30Y/V38D/V41R/L97bV/H99Q/C122S/M157K	6030
181	F30Y/V38D/V41R/L97bV/H99Q/C122S/Y149N/Y151F/M157K	7110
530	F30H/V38D/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157S/Q192L	7340

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
194	F30Y/H37D/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K/R217G	7760
755	V38D/L97bR/H99E/C122S/E175D/R217A/K224S	7770
758	V38D/L97bR/H99E/C122S/E175D/R217A/K224Q	7770
775	F30Y/V38D/Y40H/V41K/L97bA/H99Q/C122S/Y151K/M157R/Q192E	7770
776	F30Y/V38D/Y40H/V41K/L97bA/H99Q/C122S/Y151K/M157S/Q192E	7770
777	F30Y/V38D/Y40H/V41K/L97bA/H99Q/C122S/Y151K/Q192E	7770
778	F30M/V38D/Y40F/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151G/Q192T	7770
779	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151M/M157R/Q192T	7770
780	F30H/V38D/Y40P/V41K/L97bA/H99Q/C122S/Y151H/M157E/Q192A	7770
296	V38D/L97bR/H99E/C122S/E175D	7770
804	V38E/T39W/V41T/D60aP/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149V/Y151G/Q192T	7770
303	V38D/H99Q/C122S/R217Q	7770
304	V38D/L97bG/C122S/R217Q	7770
856	V38D/V41R/L97bT/C122S/Y151F/R217E	7770
858	V38D/V41R/L97bN/H99E/C122S/E175D/Q192M/R217E	7770
911	R36H/V38D/T39R/Y40F/V41R/H99S/C122S/R217T	7770
918	R36S/V38D/T39A/V41R/L97bV/H99S/C122S/R217T	7770
905	R36L/V38D/T39R/Y40L/V41T/L97bD/H99P/C122S/R217S	7770
913	R36S/V38D/T39K/Y40M/V41K/L97bI/C122S/R217E	7770
919	R37aH/V38D/T39R/Y40F/L97bT/C122S/R217E	7770
910	V38D/T39K/Y40F/V41Q/L97bI/H99S/C122S/R217T	7770
917	V38D/T39F/Y40L/V41K/L97bT/H99S/C122S/R217T	7770
480	F30Y/V38D/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157T/Q192L	9990
474	F30H/V38D/Y40F/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151R/M157K	9990
472	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151F/M157K/Q192W	9990
185	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K/R217G	9990
188	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149F/M157K/R217G	9990
266	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K/Q192P	9990
781	R37aH/V38E/T39S/D60aR/Y60bG/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149T/Y151S	9990
782	R37aH/V38E/T39A/V41R/D60aG/Y60bG/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149V/Y151F/Q192R	9990
783	R37aH/V38E/T39H/V41R/D60aT/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149M/Y151N/Q192T	9990
784	R37aH/V38E/T39G/V41A/D60aG/Y60bE/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151K/Q192T	9990
785	V38E/T39D/V41A/D60aA/Y60bR/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149W/Y151K/Q192T	9990

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
786	V38E/T39A/V41R/D60aH/Y60bH/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149M/Y151N/Q192T	9990
787	V38E/T39F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149A/Y151G/Q192T	9990
789	R37aH/V38E/V41A/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149A/Y151M/Q192T	9990
790	R37aH/V38E/T39S/V41A/D60aG/Y60bE/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149S/Y151H	9990
791	R37aP/V38E/T39G/V41R/Y60bR/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149T/Y151P/Q192T	9990
788	V38E/T39D/V41A/D60aS/Y60bR/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149W/Y151K/Q192T	9990
298	V38D/L97bR/H99E/C122S/E175D/K224R	9990
806	V38E/T39W/V41Q/Y60bE/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149I/Y151G/Q192T	9990
803	V38E/T39W/V41T/Y60bK/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149I/Y151G/Q192T	9990
857	V38D/V41K/L97bA/H99L/C122S/Y151R/R217E	9990
915	R36S/V38D/T39K/Y40M/V41K/L97bH/H99T/C122S/R217S	9990
641	R35D/H37R/V38D/T39V/V41T/Y60bT/L97bA/H99Q/C122S/Q192A	16600
5	C122S	NA
154	V38D/T97a_L97bdel/C122S	NA
155	L73R/L97bG/H99Q/C122S	NA
409	V38D/V41T/A96E/D97E/T97aG/A98_H99del/C122S/E175K/R217H	NA
407	V38D/V41S/A96E/D97E/T97aG/A98_H99del/C122S/E175K	NA
NA	V38D/V41S/D97E/A96_-nulldelinsVG/A98_H99del/C122S/E175K/R217H	NA
408	V38D/V41A/A96_T97adelinsERG/A98_H99del/C122S/E175N	NA
NA	V38D/V41L/A96_A98del/-null_H100insRGL/C122S/Y172E/E175P	NA
406	V38D/V41S/A96D/D97E/T97aG/A98_H99del/C122S/E175S	NA
NA	V38D/V41A/A96del/-nulldelinsRG/A98_H99del/C122S/E175N/R217delinsF	NA
405	V38D/V41S/A96_T97adelinsERG/A98_H99del/C122S/E175A	NA
156	V38D/L73R/L97bG/H99Q/C122S	NA
NA	V38D/A96_-nulldelinsVG/D97E/A98_H99del/C122S	NA
NA	V38D/V41Q/A96_-nulldelinsAG/D97E/A98_H99del/C122S/R217K/K224R	NA
NA	R35S/V38_Y40delinsDRF/D60adelinsY/A96del/-nulldelinsLK/A98_H99del/C122S/Y151L	NA
NA	R35T/V38_V41delinsDRF/V41M/D60aP/A96del/-nulldelinsLK/A98_H99del/C122S/Y151L	NA
NA	R35K/V38_-nulldelinsDQHR/A96del/-nulldelinsLK/A98_H99del/C122S/Y151W	NA

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
410	R35K/V38D/T39S/Y40F/V41M/D60aN/A96D/D97L/A98K/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L	NA
NA	R35K/V38D/T39S/Y40F/V41M/D60aN/A96del/-nulldelinsLK/A98_H99del/C122S/Y151L	NA
NA	R35S/V38E/T39S/Y40H/V41R/A96del/-nulldelinsLK/A98_H99del/C122S/Y151W	NA
NA	R35K/V38D/T39K/Y40F/A96del/-nulldelinsLK/A98_H99del/C122S/Y151delinsG	NA
411	V38D/V41R/A96E/D97G/T97adelinsSG/A98_H99del/C122S	NA
412	V38D/L97bG/H99P/C122S/R217V/K224Q	NA
412	V38D/L97bG/H99P/C122S/R217V/K224Q	NA
413	V38D/A96G/D97R/A98G/T97adel/H99I/L97bdel/C122S	NA
NA	V38D/A96_-nulldelinsRGI/A98G/C122S	NA
414	V38D/A96E/D97E/T97aG/A98_H99del/L97bM/C122S	NA
NA	V38D/V41R/A96del/-null_T97ainsG/-null_L97binsG/A98_H99del/C122S/R217A	NA
415	V38D/V41R/A96D/D97G/T97aN/A98G/L97bdel/H99L/C122S/R217F	NA
NA	V38D/V41R/-nulldelinsDG/D97N/T97aG/A98_H99del/C122S/R217delinsF	NA
NA	V38D/V41R/A96E/-null_L97binsG/D97E/A98_H99del/C122S/E175K/R217E/K224S	NA
416	V38D/V41Q/A96E/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/R217H	NA
416	V38D/V41Q/A96E/D97E/T97aG/A98_H99del/C122S/R217H	NA
NA	V38D/V41S/A96del/-nulldelinsRG/A98_H99del/C122S/R217delinsY	NA
NA	V38D/V41R/A96del/-nulldelinsGG/A98_H99del/C122S/R217D	NA
418	V38D/V41K/A96D/D97E/T97aG/A98_H99del/C122S/R217K/K224N	NA
419	R36H/V38D/V41M/D97E/T97aG/A98_H99del/C122S/R217D	NA
419	R36H/V38D/V41M/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/R217D	NA
420	V38D/V41H/A96D/D97E/T97aG/A98_H99del/C122S/R217delinsF	NA
421	V38D/D97E/T97aG/A98_H99del/C122S/E175G/R217H	NA
NA	V38D/A96P/D97_-nulldelinsVG/A98_H99del/C122S	NA
157	L97bP/H99L/C122S	NA
NA	-null_H99delinsRVG/L97bM/C122S	NA
NA	V41R/A96del/-null_T97ainsG/-null_L97binsG/A98_H99del/C122S	NA
NA	-null_H99delinsRG/D97G/L97bM/C122S/R217E/K224R	NA
423	V38D/L97bA/H99Q/C122S	NA
425	V38D/V41Q/A96N/D97G/T97aI/A98G/L97bdel/H99L/C122S	NA
427	V38D/V41K/A96K/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S	NA
426	R35S/V38D/V41T/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S	NA
428	R36H/V38D/V41S/A96E/D97R/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/K224R	NA

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
158	R37aP/V38D/V41R/A96D/D97G/T97aN/A98G/L97bdel/H99L/C122S/M157K/R217F	NA
159	R37aS/G37bD/V38D/V41R/A96D/D97G/T97aN/A98G/L97bdel/H99L/C122S/R217F	NA
160	R36H/V38D/V41R/A96D/D97G/A98R/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/M157K/R217D	NA
161	R37aH/V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/S174P/R217D	NA
162	R37aH/V38D/V41G/A96G/D97E/T97aA/A98G/L97bdel/H99M/C122S/Y151N	NA
163	R36S/V38D/Y40L/V41R/A96P/D97V/T97aR/A98G/L97bdel/H99L/C122S	NA
165	V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Q192E/R217D	NA
166	F30Y/V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/M157K/R217D	NA
431	V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151K/Q192E/R217D	NA
433	V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151W/Q192M/R217D	NA
437	V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151N/Q192M/R217D	NA
439	R36H/V38D/Y40H/V41K/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151K/Q192V/R217D	NA
440	R36H/V38D/Y40L/V41K/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151R/Q192L/R217D	NA
441	R36H/V38D/Y40V/V41K/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151F/Q192F/R217D	NA
442	R36H/V38D/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151K/Q192E/R217D	NA
443	R36H/V38D/Y40L/V41K/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151K/Q192E/R217D	NA
449	R36H/V38D/V41K/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151K/Q192E/R217D	NA
453	R36H/V38D/Y40F/V41K/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151R/Q192E/R217D	NA
454	R36H/V38D/Y40L/V41R/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151N/Q192V/R217D	NA
455	R36H/V38D/Y40L/V41R/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151N/Q192D/R217D	NA
456	R36H/V38D/V41R/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151K/Q192E/R217D	NA
457	R36H/V38D/Y40F/V41R/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151K/Q192E/R217D	NA

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	ED50 (nM)
458	R36H/V38D/Y40I/V41A/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151M/Q192L/R217D	NA
459	R36H/V38D/Y40H/V41M/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/R217D	NA
464	R36H/V38D/V41R/A96D/D97G/T97aN/A98G/L97bdel/H99L/C122S/G193R/R217F	NA
467	V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Q192R/R217D	NA
468	F21S/R36H/V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/E175D/R217D	NA
470	R36H/V38D/V41R/A96D/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/G193R/R217D	NA
168	V38D/Y40P/V41K/L97bA/H99Q/C122S/M157K	NA
430	V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151M/Q192E/R217D	NA
512	F30H/R35T/H37M/V38D/V41R/D60aS/Y60bT/L97bA/H99Q/A112V/C122S/Y151L/M157K/R217T	NA
220	V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S	NA
531	F30N/V38D/Y40F/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157S/Q192H	NA
257	F30Y/R35Y/R36H/H37E/V38E/T39S/Y40H/V41W/Y60bW/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192F	NA
306	V38D/L97bG/H99Q/C122S/S195A/R217Q	NA
342	V38D/C122S/S190H/G216A	NA

* SEQ ID el de un dominio de proteasa de ejemplo que contiene los reemplazos

Ejemplo 3

Actividad anti-C3 de variantes de u-PA en plasma de macaco cynomolgus

La actividad anti-C3 *ex vivo* de algunos polipéptidos de u-PA modificados se midió en plasma de macaco cynomolgus comprado (BioChemed). La dosis efectiva mediana (ED_{50}) de polipéptidos de u-PA modificados para escindir C3 se calculó usando ELISA. Brevemente, los polipéptidos de u-PA modificados de ejemplo se diluyeron en serie 1:1.5 veces de 1000 nM a 39.0 nM (dilución de 9 puntos). El estándar hC3 se diluyó en serie 1:1.5 veces de 450 a 39 (dilución de 7 puntos) en BSA al 1% en 1X PBST (Tween-20 solución salina amortiguada con fosfato) Una receta para 1X PBST incluye:

1. Disolver lo siguiente en 800 ml de H_2O destilado
   - 8g de NaCl
   - 0.2g de KCl
   - 1.44g de Na_2HPO_4
   - 0.24g de KH_2PO_4
   - 2 ml de tween-20

2. Ajustar pH a 7.2

3. Ajustar el volumen a 1L con H_2O destilado adicional

4. Esterilizar en autoclave.

Se incubó plasma vítreo Cynomolgus al 80% (obtenido de BioChemed) en solución amortiguadora que contiene Tris 50 mM, pH 8.0, NaCl 50 mM y Tween-20 al 0.01%, y diluciones de C3 con polipéptidos de u-PA modificados a una concentración final de 0.1 µM a 37ºC durante 10 minutos. Los digeridos plasmáticos al 80% se diluyeron 1:15625 en BSA al 1% en 1X PBST usando el sistema de manejo de líquidos Biomek (Beckman Coulter). Las placas de EIA de fondo plano (Bio-Rad) recubiertas con anticuerpo A213 purificado (anti-C4; productos especiales Quidel) a 2.0 µg/mL, se incubaron con 50 µL/pocillo de muestra o estándar y se detectaron con anticuerpo anti-hC3a (ab11872; Abcam) en BSA al 1% en 1x PBST. Los pocillos se recubrieron adicionalmente con anticuerpo anti-HPR de cabra conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch; número de catálogo: 115-035-003) a una dilución 1:30000 en BSA al 1% en 1x PBST y desarrollado con sustrato HRP WesternBright ECL (quimioluminiscente) para detección.

El ED_{50} se define como la concentración de proteasa que produce una pérdida del 50% de C3. Los resultados muestran una mayor pérdida (*es decir*, escisión) de C3 en presencia de los polipéptidos de u-PA modificados con la secuencia expuesta en SEQ ID nos: 8-14 y 16-20. El dominio de proteasa de polipéptido de u-PA con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 8, escindido con un ED_{50} que era varias veces mayor que los demás. Los resultados se exponen en la Tabla 15 a continuación.

Tabla 15: Actividad anti-C3 en plasma de macaco cynomolgus

Numeración de quimotripsina	**SEQ ID NO***	**80% de ED_{50} de plasma cynomolgus (10 min, nM)**
F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	8	1700
F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	9	176
F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	10	114
R35W/R36H/H37N/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192H	11	309
F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	12	286
F30Y/R35W/R36H/H37N/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	13	222
F30Y/R35W/R36H/H37P/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	14	145

F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39F/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	16	481
F30Y/R35Y/R36H/H37P/R37aQ/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bH/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	17	215
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aT/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	18	244
R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	19	214
R35W/H37D/R37aP/V38E/T39W/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	20	175

* SEQ ID del dominio de proteasa de ejemplo que contiene los reemplazos

Ejemplo 4

Actividad anti-C3 de polipéptidos de u-PA modificados en humor vítreo de macaco cynomolgus

La actividad de polipéptidos de u-PA modificados se evaluó mediante escisión de la proteína C3 humana de complemento de sustrato. Se incubó C3 humana purificada 2 μM (Complement Technologies; Tyler, TX) con los polipéptidos de u-PA modificados (0 – 250 nM) durante 1 hora a 37ºC en humor vítreo de mono comprado (BioChemed). La actividad de los polipéptidos de u-PA modificados se inactivó entonces mediante la adición del inhibidor de uroquinasa Glu-Gly-Arg Clorometil Ketone (EGR-CMK; Haematologic Technologies, EGRCK-01) a una concentración final de 10 μM y la mezcla de polipéptido de u-PA modificado/hC3 se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Los niveles residuales de C3 humano no digerido se cuantificaron usando un ELISA. Todos los polipéptidos de u-PA modificados, incluidos aquellos que contienen los reemplazos R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R, Y40Q/V41L/L97bA/C122S y Y40Q/V41L/L97bA/C122S, y Y40Q/V41R/L97bA/C122S, proteína de complemento escindida C3 con un número de rotación mayor (por hora) que el polipéptido de u-PA de referencia que contiene el reemplazo C122S expuesto en SEQ ID NO: 5. Los resultados se exponen en la Tabla 16 a continuación.

Tabla 16: Escisión de C3 en el humor vítreo

Numeración de quimotripsina	SEQ ID NO*	Número de rotación C3 (hr^{-1})
u-P tipo silvestre u-PA con C122S	5	0.3
V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	15	29
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	21	48
Y40Q/V41L/L97bA/C122S	40	8
Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	34	42
V38E/Y40Q/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	35	17

Tabla 16: Escisión de C3 en el humor vítreo		
Numeración de quimotripsina	**SEQ ID NO***	**Número de rotación C3 (hr^{-1})**
V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S	36	56
V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/H99Q/C122S	37	18
V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/C122S	38	12
R37aS/V41R/L97bG/H99Q/C122S	41	5
T39Y/V41R/L97bA/H99Q/C122S	42	17
T39Y/V41R/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S	43	26
T39Y/V41R/D60aP/L97bA/H99Q/C122S	44	17

* SEQ ID del dominio de proteasa que contiene los reemplazos

Ejemplo 5

Estabilidad *ex vivo* de polipéptidos de u-PA modificados en humor vítreo de macaco cynomolgus

La estabilidad *ex vivo* de polipéptidos de u-PA modificados se evaluó en humor vítreo de macaco cynomolgus comprado o control con solución salina amortiguada con fosfato (PBS). Se pueden usar polipéptidos de u-PA modificados que exhiben estabilidad en humor vítreo para el tratamiento de AMD.

Se incubó humor vítreo cynomolgus al 80% (obtenido de BioChemed; números de catálogo BC7615-V1, BC60815-V1, BC33115-V6) en solución amortiguadora que contiene Tris 50 mM, pH 8.0, NaCl 50 mM y control Tween-20 o PBS al 0.01% con polipéptidos de u-PA modificados a una concentración final de 0.1 µM. Estas mezclas se incubaron a 37°C durante 7 días y la actividad de proteasa residual se evaluó con sustrato fluorogénico 100 µM AGR-ACC (7-amino-4-carbamoilmetil-coumarina) en Tris 50 mM, pH 8.0, NaCl 50 mM, Tween-20 al 0.01% (los resultados del ensayo se evaluaron a una longitud de onda de excitación =380 nm y longitud de onda de emisión =460 nm). Los resultados muestran que los polipéptidos de u-PA modificados con la secuencia expuesta en SEQ ID nos: 21-33 exhiben actividad comparable en plasma de cynomolgus y PBS. Los resultados se exponen en la Tabla 17 a continuación.

Tabla 17: Estabilidad de polipéptidos de u-PA modificados en humor vítreo			
		Actividad (%) en el día 7	
Numeración de quimotripsina	**SEQ ID NO***	**vítreo**	**PBS**
dominio de proteasa de u-PA tipo silvestre con C122S	5	102	111
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	21	83	94
H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	22	73	79

R35Q/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	23	88	92
R35Q/H37Y/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	24	87	99
R35Q/H37Y/R37aE/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	25	105	103
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	26	93	108
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	27	88	100
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	28	93	97
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	29	58	61
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	30	86	92
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/H99Q/C122S/Y149R	31	90	111
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/C122S/Y149R	32	89	108
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	33	74	99

* SEQ ID del dominio de proteasa de ejemplo que contiene los reemplazos

La estabilidad *ex vivo* de las variantes de u-PA anti-C3 en la Tabla 18 a continuación se evaluó después de la incubación en humor vítreo de macaco cynomolgus comprado durante 7 y 28 días. Los resultados muestran que varias de las variantes mantienen una actividad significativa incluso después de la incubación de 28 días. Los resultados se exponen en la Tabla 18 a continuación.

Tabla 18: Estabilidad de polipéptidos de u-PA modificados en humor vítreo

		Actividad (%)	
Numeración de quimotripsina	**SEQ ID NO***	**Día 7**	**Día 28**
u-PA tipo silvestre con C122S	5	106	90
V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	15	43	n/d
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	21	83	34
Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	34	42	n/d
V38E/Y40Q/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	35	28	n/d
V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S	36	17	n/d
V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/H99Q/C122S	37	73	n/d
V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/C122S	38	71	n/d
Y40Q/V41L/L97bA/C122S	40	56	28
R37aS/V41R/L97bG/H99Q/C122S	41	100	74
T39Y/V41R/L97bA/H99Q/C122S	42	92	61
T39Y/V41R/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S	43	98	58
T39Y/V41R/D60aP/L97bA/H99Q/C122S	44	86	42

* SEQ ID del dominio de proteasa que contiene los reemplazos

Ejemplo 6

Ensayo farmacodinámico *ex vivo* en plasma humano

Los polipéptidos de u-PA modificados (dominios de proteasa) se incubaron con plasma humano al 80% antes de la adición de eritrocitos para evaluar la escisión de la proteína C3 de complemento en un ensayo hemolítico de actividad del complemento. Se realizaron ensayos funcionales en presencia de pruebas de plasma humano la actividad de las proteasas anti-C3 en un entorno farmacéuticamente relevante y, por ejemplo, examina si son sensibles a la inactivación por serpinas u otros inhibidores de proteasa presentes en la sangre humana. Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente no se inhibieron, en general, en la presencia de plasma humano. Esto es de importancia para el tratamiento de enfermedades y trastornos y condiciones, tal como DGF, en los cuales los polipéptidos de u-PA modificados administrados se exponen al plasma humano, tal como cuando se administran por vía intravenosa. Es de menor o ninguna importancia para aplicaciones, tal como tratamiento de AMD mediante inyección intravítrea o intrarretiniana o subretiniana, donde los polipéptidos de u-PA modificados no se exponen al plasma.

Se midió un valor de ED_{50}, que es la concentración de proteasa en la que se logra una inhibición del 50% de la actividad del complemento. El dominio de proteasa de u-PA tipo silvestre (SEQ ID NO:5, con C122S) y varios dominios de proteasa u-PA modificados de ejemplo se diluyeron en serie de 3 µM a 0.11 µM (dilución en serie de 9 puntos 1:2) para medir el ED_{50}. El dominio de proteasa de u-PA (SEQ ID NO:5) tipo silvestre y los dominios de proteasa u-PA modificados se preincubaron con una concentración final de 80% de plasma en un tubo de 0.2 mL mediante la combinación de 4 µL de solución de proteasa diluida y 16 µL de plasma humano (con citrato de sodio como anticoagulante; Innovative Research, Inc.). Esto dio como resultado una dilución adicional de la proteasa para dar una concentración final de 0.6 µM a 0.0022 µM de proteasa para el protocolo EC_{50}. También se incluyó un control sin proteasa (18 µL de plasma y 2 µL de PBST) y un control de fondo (20 µL de PBST solamente) en los ensayos. La reacción se incubó a 37°C durante 1 hora. Las mezclas de reacción se diluyeron adicionalmente a plasma al 20% con la adición de 70 µL de PBST.

Los eritrocitos de oveja sensibilizados (Diamdex, Miami, FL) se concentraron a 10X al sedimentar una alícuota de 3.0 ml, retirar 2.7 mL de solución amortiguadora y resuspender el sedimento celular en la solución amortiguadora de 0.3 ml restante. Los eritrocitos sensibilizados concentrados se adicionaron a placas de polipropileno de 96 pocillos a un volumen de 12 µL por pocillo. Se adicionaron mezclas preincubadas de proteasa/plasma a 6 µL o 60 µL a los eritrocitos para proporcionar una concentración final de plasma al 1% o plasma al 10%, respectivamente, en un volumen final de 120 µL (PBST adicionado al volumen

final). La solución se incubó con agitación a temperatura ambiente durante 45 minutos. Las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos para sedimentar las células intactas, y se retiraron 100 µL de sobrenadante y se colocaron en una placa de microtitulación de 96 pocillos transparente.

La liberación de hemoglobina de los glóbulos rojos lisados se monitoreó leyendo la densidad óptica (OD) a 415 nm. La hemólisis de fracción se calculó restando el control de fondo de todos los pocillos, entonces dividiendo las muestras experimentales por el control sin proteasa (control positivo), donde la fracción de hemólisis del control positivo se estableció en 1.00. El ED_{50} (nM) de hemólisis por las proteasas se midieron graficando la hemólisis de fracción versus. concentración de proteasa en un ajuste de curva logística de 4 parámetros (software SoftMax Pro, Molecular Devices, CA).

Los resultados se muestran en la Tabla 19 a continuación, que expone el ED_{50} (nM) para hemólisis en plasma humano al 80% mediante u-PA tipo silvestre con la mutación C122S expuesta en SEQ ID NO: 5 y los polipéptidos de u-PA modificados. Como se muestra en la Tabla 19, el ED_{50} para u-PA tipo silvestre en plasma humano al 80% es mayor que 6 µM; mientras que los polipéptidos de dominio de proteasa de u-PA modificados de ejemplo tienen una capacidad significativamente mayor para inhibir el complemento como se indica por un ED_{50} inferior (*por ejemplo*, entre 173 nM y 1.028 µM).

Tabla 19: Inhibición de C3 en plasma humano

Numeración de quimotripsina	**SEQ ID NO.***	**80% de ED_{50} de plasma humano (60 min, nM)**
u-PA tipo silvestre (dominio de proteasa) con C122S	5	> 6000
F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	8	1028
F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	9	257
F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	10	195
R35W/R36H/H37N/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192H	11	208
F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	12	227
F30Y/R35W/R36H/H37N/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	13	220
F30Y/R35W/R36H/H37P/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	14	185
F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39F/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	16	220
F30Y/R35Y/R36H/H37P/R37aQ/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bH/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	17	173
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aT/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	18	253

Tabla 19: Inhibición de C3 en plasma humano		
Numeración de quimotripsina	**SEQ ID NO.***	**80% de ED_{50} de plasma humano (60 min, nM)**
R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	19	318
R35W/H37D/R37aP/V38E/T39W/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	20	196

* SEQ ID del dominio de proteasa de ejemplo que contiene los reemplazos

Ejemplo 7

Análisis cinético de la activación de plasminógeno usando un ensayo cromogénico indirecto

Se realizó un ensayo cromogénico indirecto para determinar las actividades de los polipéptidos de u-PA modificados y tipo silvestre producidos como preparaciones de proteínas purificadas (ver, Madison *et al*. (1989) *Nature*, 339: 721-724; Madison *et al*. (1990) *J Biol. Chem*., 265: 21423-21426). En este ensayo, la p-nitroanilina libre se libera del sustrato cromogénico Spectrozyme PL (sal de diacetato de H-D-norleucilhexahidrotirosil-lisina-p-nitroanilida, American Diagnostics, Inc.) por la acción de plasmina generada por la acción de u-PA sobre plasminógeno. La liberación de p-nitroanilina libre se midió espectrofotométricamente a OD_{405} nm.

Para el ensayo, se combinaron mezclas de reacción de 100 µL que contiene 0.25-1 ng de las enzimas u-PA a analizar, 0.62 mM Spectrozyme PL y 0.2 µM Lys-plasminógeno (American Diagnostics, Inc.) en un solución amortiguadora que contiene 50 mM Tris-HCL (pH 7.5), 0.1 M NaCl, 1.0 mM EDTA y 0.01% (v/v) Tween 80. La reacción se incubó a 37°C en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos (Costar, Inc.) y la densidad óptica a 405 nm (OD_{405}) se leyó cada 30 s durante 1 hora en un Thermomax de dispositivos moleculares. Se calcularon las constantes cinéticas k_{cat}, K_m y k_{cat}/K_m (constante de especificidad) (ver, *por ejemplo*, Madison, *E. L* (1989) *Nature* 339: 721-724).

Los resultados se exponen en la Tabla 20 a continuación. Los resultados muestran que los polipéptidos de u-PA modificados tienen actividad de enzima significativamente disminuida para el plasminógeno de sustrato. Todos los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente tienen actividad y especificidad reducidas para plasminógeno; y todos tienen múltiples aumentos en especificidad y actividad en C3, y para inhibir la activación del complemento en comparación con el u-PA no modificado.

Tabla 20: Análisis cinético de activación de plasminógeno		
Numeración de quimotripsina	**SEQ ID NO.***	**k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)**
u-PA tipo silvestre con C122S	5	1.54E+04
F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	8	4.03E+02
F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	9	<1.0E+01
F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	12	<1.0E+01
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aT/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	18	<1.0E+01
R35W/H37D/R37aP/V38E/T39W/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	20	<1.0E+01
F30Y/R35Y/R36H/H37P/R37aQ/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bH/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	17	<1.0E+01

* SEQ ID del dominio de proteasa de ejemplo que contiene los reemplazos

Ejemplo 8

Actividad anti-C3 y estabilidad de la variante u-PA anti-C3 en humor vítreo de macaco cynomolgus *in vivo*

Se evaluó la actividad *in vivo* y la estabilidad del polipéptido de u-PA modificado expuesto en SEQ ID NO:21, que es el dominio de proteasa que contiene los reemplazos R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R. La estabilidad en el humor vítreo y la capacidad de escindir C3 son parámetros indicativos de un candidato para el tratamiento de AMD.

Se asignaron doce macacos cynomolgus ingenuos a un grupo de tratamiento individual. Se administró por vía intravítrea a los animales de estudio una dosis individual de 125 µg de polipéptido de u-PA modificado en un ojo. Se administró el dominio de proteasa aislado cuya secuencia se expone en SEQ ID NO:21, que tiene un peso molecular de aproximadamente 25 kDa. El ojo derecho recibió el artículo de prueba y el ojo izquierdo se inyectó con control del vehículo. Se sacrificaron cuatro animales en cada uno de los siguientes puntos de tiempo: 24 horas después de la dosis, día 2 y el día 6. Las muestras de humor vítreo se recolectaron de los ojos derecho e izquierdo y se analizaron para la estabilidad del polipéptido de u-PA modificado y el nivel de C3 después del tratamiento con polipéptido de u-PA modificado o control del vehículo; ELISA determinó la concentración de C3 y polipéptido de u-PA modificado como se detalló anteriormente.

La concentración del polipéptido de u-PA modificado presente en muestras de humor vítreo obtenidas 24 horas después de la dosis, el día 2 y el día 6 se determinó por ELISA. La actividad de los polipéptidos de u-PA modificados se inactivó entonces mediante la adición de EGR-CMK (Haematologic Technologies, EGRCK-01) a una concentración final de

10 µM y la mezcla de polipéptido de u-PA modificado/hC3 se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Se determinó que la semivida de polipéptido de u-PA modificado de SEQ ID NO:21 era de aproximadamente 2 días, lo que debería corresponder a aproximadamente 5 días en un sistema humano (Deng *et al*. MAbs 3(1): 61-66 (2011)). La recuperación *in vivo* (*es decir,* el nivel pico de polipéptido de u-PA modificado dividido por la dosis de polipéptido de u-PA modificado) del polipéptido de u-PA modificado (de SEQ ID NO:21) se calculó mediante ELISA a partir del nivel máximo observado de polipéptido de u-PA modificado. El valor teórico predicho para la recuperación *in vivo* al 100% fue de 2.5 µM. La recuperación *in vivo* medida del dominio de proteasa de u-PA modificado (SEQ ID NO: 21) que contiene los reemplazos:

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R se calculó que era aproximadamente el 80% del valor predicho, o aproximadamente 2.0 µM.

Los niveles de C3 en humor vítreo se evaluaron mediante ELISA como se detalla en el Ejemplo 3. Los niveles de C3 en el ojo de control negativo inyectado en el vehículo oscilaron entre 0.4 nM-50 nM (2 muestras de ojos inyectados en el vehículo difirieron significativamente de los otros 10, probablemente debido a la contaminación sanguínea del vítreo). El nivel de línea base de C3 antes de la administración de u-PA fue de aproximadamente 2.2 nM. C3 fue indetectable en el ojo tratado con variantes después de 1 día y 7 días. Después de 28 días, concentración de C3 en el ojo tratado con el polipéptido de u-PA modificado con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 21 fue de aproximadamente 2.2 nM, lo que es equivalente a los niveles anteriores al tratamiento. Por lo tanto, los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente son candidatos para el tratamiento de AMD.

Ejemplo 9

Mutaciones de ejemplo en u-PA y confirmación de sitios de escisión

Las posiciones y mutaciones de ejemplo en polipéptidos de u-PA, que incluyen los dominios de longitud completa, precursor y proteasa y partes catalíticamente activas de estos, se exponen en la Tabla 22 (más adelante).

Tabla 22: Mutaciones de ejemplo en u-PA

Numeración quimo	Numeración madura	peso	Mutación en el polipéptido de SEQ ID NO:21	Mutaciones de ejemplo	Conservador ante las mutaciones
30	**173**	**F**		Y,	W, F
35	**178**	**R**	Q	Q, W, Y	Y, W, F, N
36	**179**	**R**		H	N, Q
37	**180**	**H**	Y	Y, E, P D, N, G,	D, E, Q, H, P,

Tabla 22: Mutaciones de ejemplo en u-PA					
Numeración quimo	**Numeración madura**	**peso**	**Mutación en el polipéptido de SEQ ID NO:21**	**Mutaciones de ejemplo**	**Conservador ante las mutaciones**
				K, Y	R, Q, E, W, F
37a	**181**	**R**	E	E, P, Q, N	D, Q, H
38	**185**	**V**	E	E	
39	**186**	**T**	Y	W, Y, F	M, L
40	**187**	**Y**		Q, F	M, L, Y, N, Q
41	**188**	**V**	R	R, L	K
60a	**208**	**D**	P	P	S
60b	**209**	**Y**	Q	L, Q, S, A, Y, T	N, T, G, S, I, V, Q
97a	**249**	**T**	I	E, I,	D, L, V
97b	**250**	**L**	A	A, G	G, S
99	**252**	**H**	Q	Q	N
149	**306**	**Y**	R	K, R	Q, E
157	**314**	**M**		K	R, Q, E
192	**353**	**Q**		H	N, Q

Los reemplazos se encuentran en cualquier forma de u-PA, incluido el dominio de proteasa (SEQ ID NO: 2 o 5); la longitud completa (SEQ ID NO: 1 o 4) y forma madura (SEQ ID NO: 3 o 6). Los reemplazos se pueden combinar, incluso como se ejemplifica en la presente, incluyendo hasta 15-18 o más reemplazos.

Los datos muestran que los polipéptidos u-pA modificados con estas mutaciones, escinden e inactivan C3 en múltiples especies tal como mono humano y cynomolgus. La escisión de C3 humano puede estar entre los residuos 740 y 741 (SEQ ID NO:47), y esta escisión inactiva C3:

QH AR↓ASHL 737-744

P4 P3 P1 ↓P1' P4'.

Como se demuestra anteriormente, y a lo largo de la descripción, los polipéptidos de u-PA modificados se escinden e inactivan C3. Los polipéptidos de u-PA modificados se seleccionaron para la escisión en esta región, y se confirmó al probarlos. Por ejemplo, C3 se incubó con un dominio de proteasa de u-PA modificado (SEQ ID NO: 21) que contiene los reemplazos:

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R o con el dominio de proteasa de u-PA modificado (SEQ ID NO:40) con los reemplazos

Y40Q/V41L/L97bA/C122S en relaciones enzima/sustrato de 1:10 o 1:50 para un total de una hora. Las muestras se retiraron de estas reacciones a los 0, 5, 10, 20, 40 y 60 minutos, y la reacción de escisión se terminó inmediatamente en cada muestra mediante la adición de TFA y congelación instantánea en hielo seco. Antes de un análisis adicional de estas muestras, las cadenas laterales de cisteína se redujeron y alquilaron, el grupo ε-amino de cadenas laterales de lisina se bloqueó mediante tratamiento con O-metilisourea y los extremos amino peptídicos entonces se etiquetaron con NHS – SS -biotina. Los péptidos C3 biotinilados resultantes se capturaron y se digirieron adicionalmente con tripsina y proteasa GluC. Después de esta segunda digestión de proteasa, los productos peptídicos se capturaron una vez más por afinidad. La biotina entonces se retiró de los péptidos capturados mediante reducción, y la mezcla peptídica se analizó mediante LC-MS/MS. En cada punto de tiempo después de 0 minutos se observó un fragmento de MW 8289, lo que indica escisión en la arginina en el sitio QHAR en C3. No se observaron sitios de escisión de C3 adicionales en estas reacciones. Por lo tanto, los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente se escinden en QHAR.

Q H A R ↓ A S H L	737-744	P4 P3P2 P1↓P1' P4'.

Ejemplo 10

Toxicidad de u-PA en humor vítreo del macaco cynomolgus

La seguridad y tolerabilidad de los polipéptidos de u-PA modificados se evaluaron *in vivo* en monos cangrejeros. Se asignaron tres macacos cynomolgus ingenuos a cada uno de tres grupos de tratamiento. Los animales de estudio se administraron por vía intravítrea ya sea 12.5 µg, 37.5 µg o 125 µg por ojo, de cada polipéptido de u-PA modificado. El ojo derecho recibió el polipéptido de prueba y el ojo izquierdo se inyectó con control del vehículo. Se observaron clínicamente animales (*es decir,* consumo de alimentos) y se llevaron a cabo exámenes oftálmicos. El examen oftálmico incluyó biomicroscopia de lámpara de hendidura y observaciones oftalmoscópicas indirectas, seguidas de fotografía de fondo de color o tomografía de coherencia óptica (OCT) antes de la dosificación (T=0) y los días 2, 8 y 15 después de la dosificación. Todas las observaciones continuaron hasta 4 semanas o hasta su resolución.

Se evaluó el nivel de efecto adverso no observado (NOAEL) para todos los animales. NOAEL para animales a los que se les administró un polipéptido de u-PA modificado con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 42 fue ≥37.5 µg. No se observaron efectos adversos para animales a los que se les administró un polipéptido de u-PA modificado con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 21; por lo tanto, al NOAEL para animales se les administró

un polipéptido de u-PA modificado con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 21 fue ≥125 µg (equivalente a ≥375 µg/ ojo en el hombre).

Ejemplo 11

Se realizaron cálculos para identificar puntos críticos inmunogénicos candidatos en los dominios de proteasa variante u-PA tipo silvestre, una variante C122S de dominio de proteasa de u-PA (SEQ ID NO:5) tipo silvestre y dominios de proteasa variante u-PA de ejemplo para confirmar que las mutaciones en las variantes de ejemplo no introdujeron puntos críticos inmunogénicos. También se realizaron cálculos para comparar el perfil general de puntos críticos para las variantes de interés con un panel de proteínas de comparación.

Resumen de los métodos

Un paso importante en la respuesta de linfocitos T a proteínas extrañas es la unión y presentación de péptidos constituyentes (derivados de la escisión de la proteína extraña) a cualquiera de un huésped de complejos HLA expresados en las células presentadoras de antígeno. La identificación de péptidos, derivados de una proteína, que se predice que se unen a HLA conocidos se puede utilizar como una indicación de posibles puntos críticos en la secuencia para provocar una respuesta de linfocitos T. Al considerar una variante de una proteína con propiedades inmunogénicas conocidas, comparar el perfil de los inhibidores de HLA predichos puede ayudar a identificar si los cambios introdujeron nuevos puntos críticos inmunogénicos.

Los perfiles se pueden generar usando bases de datos disponibles públicamente. Por ejemplo, el servicio de predicción vinculante disponible públicamente (servidor NetMHCII 2.2), Universidad Técnica de Dinamarca, se utilizó para predecir la unión a HLA. El servidor NetMHCII 2.3 predice la unión de péptidos a alelos HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP y MHC de ratón clase II utilizando redes de neuronas artificiales. Las predicciones se pueden obtener para 25 alelos HLA-DR, 20 HLA-DQ, 9 HLA-DP y 7 alelos H2 de clase II de ratón. Los valores de predicción se proporcionan en valores de IC_{50} nM y como un % de Rango a un conjunto de 1000000 de péptidos naturales aleatorios. Los péptidos de unión fuertes y débiles se indican en la salida.

El servicio se utilizó para predecir la afinidad de unión de todos los péptidos posibles de 15 aminoácidos contiguos en variantes de ejemplo (SEQ ID NO:40 y SEQ ID NO:21), el dominio de proteasa tipo silvestre (SEQ ID NO:2) y el dominio de proteasa tipo silvestre con C122S (SEQ ID NO:5) contra un panel de 14 variantes HLA-DR (ver Tabla B, más adelante) en función de la secuencia primaria del péptido. Para cada par péptido/HLA, el servidor NetMHCII proporciona una afinidad de unión prevista, así como una clasificación como un aglutinante hermético ($K_d \leq 500$), aglutinante débil $K_d \leq 50$ nM) o no aglutinante (K_d

> 500 nM). Para una secuencia proteica que contiene *N* aminoácidos, esto da como resultado un total *de T* = (*N-14*) x 14 posibles pares de unión péptido-HLA.

Usando las predicciones de unión del servidor NetMHCII, los resultados se usaron para identificar posibles puntos críticos en estas secuencias de proteínas, en función de áreas donde se identificaron varios pares de unión candidatos. Estos cambios se compararon con los cambios conocidos en las secuencias de proteínas correspondientes.

Para cada proteína, un puntaje de unión general basado en la cantidad de pares de péptido-HLA de unión estrecha predichos (*TB*), la cantidad de pares de péptido-HLA de unión débil predichos (*WB*) y la cantidad total de pares de péptido-HLA considerados (*T*) como:

*Puntuación = (TB + 0.5 * WB) / T*

Tabla B - Moléculas HLA-DR incluidas como posibles aglutinantes

HLA-DRB1*1101
HLA-DRB1*0101
HLA-DRB1*0301
HLA-DRB1*0401
HLA-DRB1*0404
HLA-DRB1*0405
HLA-DRB1*0701
HLA-DRB1*0802
HLA-DRB1*0901
HLA-DRB1*1302
HLA-DRB1*1501
HLA-DRB3*0101
HLA-DRB4*0101
HLA-DRB5*0101

Esta puntuación ha mostrado un buen acuerdo con las predicciones de inmunogenicidad *in silico* generadas por la empresa EpiVax (Providence, RI), que utiliza inmunoinformática y técnicas *in vitro* para predecir la inmunogenicidad, al utilizar un subconjunto de 8 HLA. Se utilizó este subconjunto de 8 HLA. Los mismos cálculos se realizaron en un panel de proteínas estándar para proporcionar un conjunto de comparación contra el cual comparar las variantes de u-PA.

Impacto de las mutaciones en los perfiles de unión HLA predichos

El número de veces de una posición de secuencia dada para cualquiera de los dominios de proteasa u-PA variantes para cada complejo de -HLA a un corte K_d de 50 nM y

500 nM. La escala en cada columna es fija, pero difiere entre columnas y se compara con los polipéptidos tipo silvestre para evaluar si las mutaciones alteraron el perfil inmunogénico. No se observaron diferencias significativas entre los polipéptidos.

Puntuaciones de Inmunogenicidad Agregada

Para calcular una puntuación de inmunogenicidad agregada para cada secuencia, la cantidad total de pares de unión a péptido-HLA en cada umbral de unión a través de un panel de 8 HLA (Tabla C) que previamente han sido validados por EpiVax (Providence, RI) para proporcionar un buen acuerdo con las puntuaciones de inmunogenicidad publicadas *en silicio*. EpiVax es una empresa que utiliza inmunoinformática y técnicas *in vitro* para predecir la inmunogenicidad. Estos valores entonces se utilizaron para calcular una puntuación general como se describe en el resumen de métodos anterior.

Tabla C- Subconjunto HLA-DR utilizado para la puntuación de inmunogenicidad general

HLA-DRB1*0101
HLA-DRB1*0301
HLA-DRB1*0401
HLA-DRB1*0701
HLA-DRB1*0802
HLA-DRB1*1101
HLA-DRB1*1302
HLA-DRB1*1501

La cantidad de pares de unión de péptido — HLA para el subconjunto de 8 HLA y las puntuaciones compuestas para uPA se muestran a continuación:

ID Secuencia	# apretado (*TB*)	# débil (*WB*)	possible total (*T*)	Puntuación
2 (WT)	98	526	1888	.191
5 (WTS)	109	542	1888	.201
40	107	528	1912	.194
21	96	514	1912	.185

Los resultados indican que la inmunogenicidad de las variantes no debe ser diferente de los polipéptidos tipo silvestre. A continuación se muestran los resultados del mismo análisis para un panel de proteínas comparadoras:

Secuencia	# apretado (*TB*)	# débil (*WB*)	Posible total (*T*)	Puntuación
Folitropina beta	13	120	920	0.079
Fibrinógeno-Alfa	125	582	5040	0.083
Insulina	32	107	768	0.111

Albúmina	192	743	4760	0.118
Amilasa	210	711	3976	0.142
Trombopoyetina	266	609	2712	0.210
Interferón beta	175	353	1384	0.254
Interleucina-11	233	316	1480	0.264

Ejemplo 12

Activación de plasminógeno por polipéptidos de u-PA en peso y variantes

La eficiencia catalítica para la activación de Glu-plasminógeno por variantes en peso y anti-C3 de polipéptidos de u-PA proporcionados en la presente se probó como se describe a continuación. Los datos de estos experimentos demostraron que las proteínas variantes anti-C3 u-PA mostraron una actividad significativamente reducida hacia el plasminógeno, un sustrato fisiológicamente relevante de u-PA tipo silvestre. En combinación con los datos del Ejemplo 7, estos datos demuestran que los polipéptidos de u-PA anti-C3 muestran no solo una actividad sustancialmente mayor hacia un sustrato “nuevo”, C3, sino también una actividad sustancialmente reducida hacia el sustrato fisiológico normal de u-PA en peso.

Las mutaciones introducidas en las variantes anti-C3 descritas en esta solicitud, por lo tanto, han alterado dramáticamente la especificidad del sustrato de los polipéptidos variantes anti-C3 en comparación con la de wt-u-PA.

Activación de plasminógeno por polipéptidos de u-PA variantes de peso y anti-C3

1) Análisis utilizando una reacción de punto de tiempo único (37 C durante 30 minutos)

a) **Condiciones de reacción**

Se midió actividad de activación de plasminógeno para u-PA/C122S tipo silvestre (**SEQ ID NO:5**) así como variantes de polipéptido anti-C3 u-PA que contienen las mutaciones Y40Q/V41L/L97bA/C122S **(SEQ ID NO:40)** y R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R (**SEQ ID NO:21**). Las concentraciones de proteasa en la mezcla de reacción fueron 25 nM (wt-u=PA) o 250 nM (variante anti-C3 u-PA) y la concentración de sustrato (*es decir*, Glu-plasminógeno) fue de 2.5 uM. El volumen de reacción fue de 20 uL y la reacción continuó durante 30 minutos a 37°C. Cada reacción se terminó mediante la adición de 2 uL de DTT 1 M y 7 uL de solución amortiguadora de muestra 4X, y calentamiento a 80ºC durante 45 s. Las mezclas de reacción terminadas se cargaron en pocillos individuales de un gel BIS-TRIS al 4 – 12% y se ejecutaron en solución amortiguadora XT MES a 200 V durante 45 min y entonces se tiñeron con SimplyBlue SafeStain.

b) Medición del producto de reacción (es decir, plasmina)

El análisis del gel SDS teñido indicó que el u-PA en peso escindió todo el plasminógeno presente en la reacción, convirtiéndolo en plasmina activa de dos cadenas durante la incubación de 30 minutos. Por el contrario, la actividad de la variante Y40Q/V41L/L97bA/C122S (seq ID 40) de u-PA en esta reacción fue sustancialmente menor que la de wt-u-PA, mientras que no se observó activación de plasminógeno por la variante R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R de u-PA en esta reacción.

2) Cinética de la activación de Glu-plasminógeno por polipéptidos anti-C3 u-PA

El análisis cinético de la activación de Glu-plasminógeno por polipéptidos variantes uPA anti-C3 o en peso se realizó como se describe a continuación. Las reacciones de activación se realizaron a 37°C en un solución amortiguadora Hepes/NaCl/EDTA I = 0.16 M que contiene BSA al 0.1%. Los polipéptidos U-PA estuvieron presentes a concentraciones de 1 (peso) o 10 (variante) nM. Las constantes de velocidad de segundo orden (kcat/KM) se derivaron de la relación lineal ajustada de las velocidades de reacción iniciales para hidrólisis (por la plasmina del producto de reacción) del sustrato cromogénico S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA·2HCl) frente a la concentración de Glu-plasminógeno (*es decir*, sustrato u-PA) (0 – 4 µM). Ver también la Tabla 24.

SEQ ID NO.	Mutaciones	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	± S.D.	% CV	n =	Relación a TS
5	C122S (WT)	2.28E+04	2.62E+03	11.5%	4	1
423	V38D/L97bA/H99Q/C122S	1.38E+03	1.79E+02	12.9%	4	17
8	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	4.59E+02	6.42E+01	14.0%	4	50
254b*	C[4]S/F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bH/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192A	9.91E-01	1.88E+00	190.0%	4	23034

La mutación C4S no se encuentra en el dominio de proteasa

La comparación entre 15 variantes mostró los resultados en la Tabla 24 adjunta a continuación etiquetada “Activación de Glu-Plasminógeno por Variantes u-PA anti-C3”.

Para Tabla 24:

El Glu-plasminógeno se activó mediante uPA C122S o variantes uPA seleccionadas a concentraciones de proteasa de 1 nM o 10 nM de proteasa

Las reacciones se llevaron a cabo a 37°C en un solución amortiguadora Hepes/NaCl/EDTA I = 0.16 M que contiene BSA al 0.1%

Las constantes de velocidad de segundo orden (kcat/KM) se derivaron de la relación lineal ajustada de las velocidades de reacción iniciales para la hidrólisis del sustrato cromogénico S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA·2HCl) frente a la concentración de Glu-plasminógeno (0 – 4 μM).

Ejemplo 13

Ejemplo de escisión de mutantes de dominio de proteasa de u-PA de proteína de complemento C3 en humor vítreo de mono cangrejero

Los mutantes de ejemplo se muestran en la Tabla 23 a continuación con referencia al dominio de proteasa WT u-PA expuesto en SEQ ID NO: 5. Las células sombreadas indican que los polipéptidos de u-PA modificados mutan en este residuo cuando se comparan con el polipéptido de u-PA de referencia expuesto en SEQ ID NO: 5. Las células no sombreadas indican que los polipéptidos de u-PA modificados contienen el mismo aminoácido que el polipéptido de u-PA de referencia expuesto en SEQ ID NO: 5. La actividad de los polipéptidos de u-PA modificados se determinó mediante escisión de la proteína C3 de complemento de sustrato como se detalla y se presenta en el Ejemplo 2 y se presentan como los niveles residuales de C3 (nM) después del tratamiento con u-PA. La escisión de C3 por los polipéptidos de u-PA modificados se realizó en humor vítreo de macaco cynomolgus comprado o control de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) como se detalla en el Ejemplo 3. Los resultados expuestos en la Tabla 23, a continuación, muestran que los polipéptidos de u-PA modificados exhiben mayor actividad contra C3 en comparación con el dominio de proteasa de u-PA de referencia, cuya secuencia se expone en SEQ ID NO:5. El % de actividad en humor vítreo y PBS muestran el porcentaje de actividad restante después de 7 días. Los polipéptidos de u-PA modificados son relativamente estables en comparación con el dominio de proteasa tipo silvestre de referencia de SEQ ID NO:5, con algunos que muestran más estabilidad que otros. Los candidatos terapéuticos, incluidos aquellos en la tabla posterior, son aquellos que tienen alta actividad de escisión de C3 y mayor estabilidad, particularmente en humor vítreo.

Tabla 23: Propiedades de ejemplo de polipéptidos de u-PA modificados

	Mutación por numeración de quimotripsina														**Actividad C3 (%) el día 7**	
SEQ ID NO.*:	**R35**	**H37**	**R37a**	**V38**	**T39**	**V41**	**D60a**	**Y60b**	**T97a**	**L97b**	**H99**	**C122**	**Y149**	**escisión hC3 (nM)**	**Vítreo**	**PBS**
5	**R**	**H**	**R**	**V**	**T**	**V**	**D**	**Y**	**T**	**L**	**H**	**S**	**Y**	3380	102	111
21	**Q**	**Y**	**E**	**E**	**Y**	**R**	**P**	**Q**	**I**	**A**	**Q**	**S**	**R**	19	83	94
22	**R**	**Y**	**E**	**E**	**Y**	**R**	**P**	**Q**	**I**	**A**	**Q**	**S**	**R**	51	73	79

23	**Q**	**H**	**E**	**E**	**Y**	**R**	**P**	**Q**	**I**	**A**	**Q**	**S**	**R**	46	88	92
24	**Q**	**Y**	**R**	**E**	**Y**	**R**	**P**	**Q**	**I**	**A**	**Q**	**S**	**R**	6	87	99
25	**Q**	**Y**	**E**	**V**	**Y**	**R**	**P**	**Q**	**I**	**A**	**Q**	**S**	**R**	10	105	103
26	**Q**	**Y**	**E**	**E**	**T**	**R**	**P**	**Q**	**I**	**A**	**Q**	**S**	**R**	161	93	108
27	**Q**	**Y**	**E**	**E**	**Y**	**V**	**P**	**Q**	**I**	**A**	**Q**	**S**	**R**	519	88	100
28	**Q**	**Y**	**E**	**E**	**Y**	**R**	**D**	**Q**	**I**	**A**	**Q**	**S**	**R**	30	93	97
29	**Q**	**Y**	**E**	**E**	**Y**	**R**	**P**	**Y**	**I**	**A**	**Q**	**S**	**R**	11	58	61
30	**Q**	**Y**	**E**	**E**	**Y**	**R**	**P**	**Q**	**T**	**A**	**Q**	**S**	**R**	25	86	92
31	**Q**	**Y**	**E**	**E**	**Y**	**R**	**P**	**Q**	**I**	**L**	**Q**	**S**	**R**	155	90	111
32	**Q**	**Y**	**E**	**E**	**Y**	**R**	**P**	**Q**	**I**	**A**	**H**	**S**	**R**	92	89	108
33	**Q**	**Y**	**E**	**E**	**Y**	**R**	**P**	**Q**	**I**	**A**	**Q**	**S**	**Y**	9	74	99

* SEQ ID del dominio de proteasa que contiene los reemplazos

Entre otras cosas, estos datos y los demás datos muestran que:

R35Q: esta mutación aumentó la actividad anti-C3 intrínseca (*es decir*, en solución amortiguadora) aproximadamente 2.7 veces y aproximadamente 4.3 veces en presencia de 80% de plasma humano

H37Y: esta mutación aumentó la actividad anti-C3 aproximadamente 2.4-2.5 veces en solución amortiguadora y en presencia de plasma humano al 80%

R37aE: esta mutación disminuyó la actividad anti-C3 intrínseca en aproximadamente 3.2 veces; sin embargo, en la presencia de 80% de plasma humano no tuvo ningún efecto sobre la actividad anti-C3

V38E: esta mutación mejoró la estabilidad de la proteína en solución amortiguadora y humor vítreo y mejoró la actividad anti-C3 en plasma humano al 80% ~ 1.5 veces

T39Y: Esta mutación aumentó la actividad anti-C3 intrínseca y la actividad anti-C3 en plasma humano al 80% en aproximadamente 7.5-8.5 veces

V41R: Esta mutación aumentó la actividad anti-C3 intrínseca y la actividad anti-C3 en plasma humano al 80% en aproximadamente 25 - 27 veces

D60aP: Esta mutación aumentó la actividad anti-C3 intrínseca y la actividad anti-C3 en plasma humano al 80% en aproximadamente 1.2-1.6 veces

Y60bQ: Esta mutación disminuyó la actividad anti-C3 intrínseca en aproximadamente 1.7 veces y disminuyó la estabilidad de la proteína in vitreo después de la incubación durante 7 días a 37°C en ~ 1.4 veces; pero en presencia de 80% de plasma

humano, aumentó la actividad anti-C3 en aproximadamente 1.1 veces

T97aI: Esta mutación aumentó la actividad anti-C3 intrínseca y la actividad anti-C3 en presencia de 80% de plasma humano en aproximadamente 1.2 - 1.3 veces

L97bA: Esta mutación aumentó la actividad anti-C3 en aproximadamente 6.4 - 8.2 veces en solución amortiguadora y en plasma humano al 80%

H99Q: Esta mutación aumentó la actividad anti-C3 en aproximadamente 2.9 - 4.8 veces en solución amortiguadora y 80% en plasma humano

Y149R: Esta mutación disminuyó la actividad anti-C3 en aproximadamente 1.6 - 2.1 veces en solución amortiguadora y 80% en plasma humano.

Se lograron resultados similares para los reemplazos en polipéptidos de u-PA modificados con menor carga de mutación que contienen: I41D/C122S/G151N/Q192T (ver, *por ejemplo*, el polipéptido de u-PA modificado cuya secuencia se expone en SEQ ID NO:40, y también formas de longitud completa y precursoras y maduras que contienen estos reemplazos).

Los datos indican que el u-PA modificado proporcionado en la presente escinde e inactiva C3 en una variedad de especies. Por ejemplo, la escisión de C3 humano para inactivarlo puede ser entre los residuos 740 y 741 (SEQ ID NO:47):

QH AR↓ASHL 737-744 P4 P3 P1 ↓P1' P4'.

Ejemplo 14

Clonación, expresión y preparación de u-PA-proteínas de fusión de albúmina sérica humana (HSA)

A. Clonación del polipéptido de fusión u-PA-HSA

Se generó una construcción para la expresión de una u-PA-proteína de fusión HSA (SEQ ID NO:1015). El fragmento u-PA-ligador-HSA se ensambló a partir de oligonucleótidos sintéticos y/o productos PCR y se clonó en el vector pcDNA3.4-TOPO (Invitrogen; Cat. No. A14697) para la expresión bajo control del promotor/potenciador temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMV) o un vector de expresión patentado (Lake Pharma). Se clonó una secuencia señal de secreción (SEQ ID NO: 999 (METDTLLLWVLLLWVPGSTG)) aguas arriba del dominio N-terminal u-PA (aminoácidos 1-158 de SEQ ID NO: 3), y un dominio de proteasa de u-PA modificado de ejemplo (expuesto en SEQ ID NO:987), y unido a través de un ligador (SEQ ID NO: 1002 (GGSSGG)) a la región codificante de albúmina sérica humana (HSA; SEQ ID NO: 991):

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC
DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDV

MCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL
RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECC
HGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAAD
FVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHEC
YAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLG
KVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALE
VDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFV
EKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL.

La construcción incluye el péptido de señal (aminoácidos 1-20), el dominio N-terminal de u-PA, el dominio de proteasa modificado de SEQ ID NO:21, excepto con C en la posición 122 (expuesta en SEQ ID NO: 987), el ligador GS (GGSSGG, SEQ ID NO:1002) seguido por la región codificante de HSA. La secuencia de construcción completa, expuesta en SEQ ID NO: 1015, es:

METDTLLLWVLLLWVPGSTG**S**NELHQVPSNCDCLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCPKKFGGQ
HCEIDKSKTCYEGNGHFYRGKASTDTMGRPCLPWNSATVLQQTYHAHRSDALQLGLGKHN
YCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQECMVHDCADGKKPSSPPEELKFQCGQKTLRPRFK**II**
GGEFTTIENQPWFAAIYQRYEGGSEYYRCGGSLISPCWVISATHCFIPQPKKEDYIVYLGRS
RLNSNTQGEMKFEVENLILHKDYSADIAAQHNDIALLKIRSKEGRCAQPSRTIQTI**C**LPSMYN
DPQFGTSCEITGFGKENSTDRLYPEQLKMTVVKLISHRECQQPHYYGSEVTTKMLCAADPQ
WKTDSCQGDSGGPLVCSLQGRMTLTGIVSWGRGCALKDKPGVYTRVSHFLPWIRSHTKEE
NGLAL**GGSSGG**DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFA
KTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAA
DKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSK
LVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVEND
EMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLE
KCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVST
PTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESL
VNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQL
KAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL.

B. Preparación de polipéptidos de fusión u-PA-HSA

1. Transformación y expresión de polipéptidos de fusión u-PA-HSA

El ADN que codifica para el polipéptido de fusión u-PA-HSA modificado se clonó en el vector de expresión pcDNA3_4 (Thermo Fisher) o un vector patentado (Lake Pharma) C-terminal a la secuencia señal de secreción como se detalla en la Sección A. Las proteínas

de fusión u-PA-HSA modificadas se expresaron posteriormente en un volumen de 1 L de medio de expresión durante 6 días en células de expresión HEK expi293 o expiCHO en ThermoFisher o la línea celular TunaCHO™ patentada en Lake Pharma.

2. Purificación por afinidad de polipéptidos de fusión u-PA-HSA

La forma de zimógeno de las proteínas de fusión u-PA-HSA modificadas se purificó usando el sistema vendido como el sistema de matriz de afinidad de albúmina humana CaptureSelect™ (ThermoFisher Scientific; Cat. No. 19129701L o 19127005) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se preparó una columna al adicionar aproximadamente 10 mL de resina CaptureSelect™ Affinity Matrices (ThermoFisher) a la columna. Después de dejar que la solución de almacenamiento fluyera a través de la columna, se adicionaron 10 volúmenes de columna (CV) de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2 mM, pH 7.4) para lavar la resina. A continuación, las cosechas de expresión que contienen las proteínas de fusión u-PA-HSA se aplicaron a la columna y posteriormente se lavaron con 5-10 CV de PBS. Las proteínas de fusión u-PA-HSA unidas se eluyeron con 10 CV de solución amortiguadora de elución (Tris 20 mM, $MgCl_2$ M, pH 7.0). La columna se retiró posteriormente con 10 CV de glicina (0.2 M, pH 3.0) y se neutralizó con Tris-HCl al 10 % (1.5 M, pH 7.4) y se reequilibró en PBS. Las muestras de flujo a través y los pasos de elución se recopilaron y analizaron en electroforesis en gel DE PÁGINA SDS reducida y no reducida para evaluar la pureza de la muestra. Las proteínas de fusión u-PA-HSA se dializaron durante 16 horas en PBS a 4°C.

3. Activación de plasmina de polipéptidos de fusión U-PA-HSA modificados

La plasmina escinde selectivamente un enlace individual en u-PA tipo silvestre y otros polipéptidos de fusión de u-PA que tienen la secuencia de activación de u-PA tipo silvestre para activar el zimógeno de u-PA-HSA y formar una proteína de fusión de u-PA-HSA de dos cadenas, unida a través de un disulfuro con el dominio de proteasa activa del extremo C unido al dominio de u-PA del extremo N por un enlace de disulfuro. Para estos experimentos, la construcción utilizada tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO:1015, que contiene el polipéptido de u-PA modificado de SEQ ID NO:21, excepto que C122S, mediante numeración de quimotripsina, es C122C para proporcionar una cisteína libre, y la secuencia señal (residuos 1-20 de SEQ ID NO:1015) no se incluye. Después de la activación, el producto resultante tiene dos cadenas (con referencia a SEQ ID NO:1015): una cadena A que tiene los residuos 21-178 y una cadena B que tiene los residuos 179-1022, u-PA (residuos 179-431), ligador (residuos 432-437) y HSA (residuos 438-1022). Las cadenas A y B están unidas por un enlace de disulfuro entre C168 y C299 (correspondiente a C122 por numeración de quimotripsina).

El dominio HSA permanece conjugado a través del ligador GGSSGG con el extremo C-terminal del dominio de proteasa. La activación siguió el siguiente procedimiento: una suspensión de resina plasmina-agarosa (Molecular Innovations; Cat. No. HPL-1) se preparó lavando la resina con 1x PBS, 3 veces. Posteriormente, se adicionaron 200 µL de suspensión de resina en 1x PBS por miligramo de polipéptido de fusión u-PA a una solución que contiene el polipéptido de fusión u-PA-HSA dializado en PBS. La "activación" del zimógeno de polipéptido u-PA se logró agitando suavemente la solución de proteína/resina durante 3 horas a temperatura ambiente. El zimógeno de polipéptido de u-PA-HSA modificado se convirtió a partir de entonces completamente en la correspondiente proteasa u-PA-HSA modificada activa.

Los polipéptidos de u-PA-HSA modificados activados se recuperaron de la resina de plasmina usando filtros de centrifugación de 0.2 µm (2.0 mL de capacidad) y centrifugación para recuperar u-PA-HSA modificado activado de la resina de plasmina de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para maximizar la recuperación, se pueden imaginar técnicas de filtración adicionales (en lugar de hacer girar la resina y recuperar el sobrenadante por extracción de pipetas). También se puede usar otro aparato de filtración de unión a baja proteína para filtración adicional de la resina. Las proteínas de fusión u-PA-HSA activadas se almacenaron a 4°C o se congelaron en alícuotas. La confirmación del paso de activación completa se visualizó mediante SDS-PAGE en condiciones de reducción para separar el dominio N-terminal del conjugado de fusión HSA del dominio de proteasa.

4. Inhibición de proteínas de fusión de u-PA-HSA modificadas activadas

Para algunos experimentos se deseaba usar una forma catalíticamente inactiva del polipéptido de fusión de u-PA-HSA (expuesto como residuos 21-1022 de SEQ ID NO:1015, como se discutió anteriormente; ver, por ejemplo, SEQ ID NO: 1019). Para generar una proteína designada como u-PA-HSA modificada inhibida (u-PA-HSAi), se incubó u-PA-HSA modificada activada (u-PA-HSAa) con un inhibidor del sitio activo irreversible, Glu-Gly-Arg-Chloromethylketone (EGR-CMK), para evitar cualquier autocatálisis de los polipéptidos de u-PA-HSA modificados o inactivación/escisión durante experimentos *in vivo* (ver, por ejemplo, Ejemplos 15 y 16). Para preparar el u-PA-HSAi, EGR-CMK liofilizado (Innovaciones moleculares; Cat. No. GGACK) se reconstituyó a 100 mM en HCl 10 mM. Se adicionó EGR-CMK concentrado a la muestra de u-PA-HSA modificada activada (u-PA-HSAa) a la concentración madre para alcanzar una concentración de inhibidor final de 1mM de inhibidor de EGR-CMK en 1x PBS, y la mezcla se dejó incubar durante 1 hora a TA.

Para evaluar si el u-PA-HSAa se inhibió completamente, la degradación de u-PA-HSAi modificado se comparó con u-PA-HSAa modificado en un experimento de estabilidad.

Brevemente, u-PA-HSAi modificado y u-PA-HSAa modificado se incubaron durante 0 horas, 1 día o 7 días a 37°C. La degradación modificada de u-PA-HSAi y u-PA-HSAa se monitoreó visualmente mediante electroforesis en gel SDS-PAGE reducida y no reducida en condiciones reducidas y no reducidas. Las bandas se visualizaron por Comassie u otra mancha comercialmente disponible similar. Los resultados demuestran que la preincubación con el inhibidor estabiliza el polipéptido, ya que no se observaron productos de degradación para el u-PA-HSAi modificado en ningún momento hasta 7 días, en comparación con la degradación observada de u-PA-HSAa modificado después de la incubación durante 1 día o 7 días a 37°C.

5. Purificación de polipéptidos de u-PA-HSAa y u-PA-HSAi después de la activación

Durante la ronda de purificación final, se aislaron polipéptidos de u-PA-HSA modificados activos e inhibidos de impurezas de peso molecular alto y bajo usando cromatografía de exclusión por tamaño. La purificación excluyó una especie de alto peso molecular que se eluyó como un pico discreto antes del pico principal de u-PA-HSA. La especie de alto peso molecular no se analizó adicionalmente, sin embargo, podría representar agregados o multímeros que se formaron durante los pasos de expresión o activación en el proceso. También se eliminó una especie secundaria de bajo peso molecular que se cree que está libre de albúmina generada durante la expresión o activación.

La purificación se llevó a cabo de la siguiente manera; una muestra de ~300 µL de u-PA-HSAi modificado (0.8 mg) o una muestra de ~400 µL de u-PA-HSAa modificado (0.8 mg) se cargó en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño (HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR; GE Heathcare, Cat. No. GE17-1166-01) en PBS a pH 7.0 a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. Las proteínas se purificaron generalmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante para la resina (GE Healthcare) con el pico principal que contiene u-PA-HSAi modificado o u-PA-HSAa retenido.

La calidad de las preparaciones y el grado de separación se evaluó adicionalmente mediante electroforesis en gel SDS-PAGE reductora y no reductora. Las fracciones de elución de la muestra de polipéptido de u-PA-HSAi o u-PA-HSAa modificado se cargaron en cada “carril” de un gel SDS-PAGE no reductor de 12 pocillos y se ejecutaron a 40 V hasta que las bandas fueron suficientemente distinguibles y las diversas especies de proteínas de tamaño se visualizaron mediante tinción de plata para mejorar la sensibilidad sobre la tinción de Coomassie estándar. Las fracciones que contienen bandas individuales que migran al peso molecular esperado de 75 kDa se mezclaron y congelaron a presión en nitrógeno líquido a una concentración final de aproximadamente 2 mg/ mL y se almacenaron a -80 ºC hasta su uso. La concentración final se determinó por absorción a 280 nM usando un espectrofotómetro NanoDrop. El tamaño y la expresión de la proteína se confirmaron posteriormente mediante

tinción de Comassie y SDS-PAGE. La calidad de las muestras individuales de polipéptidos de u-PA-HSA se evaluó adicionalmente mediante ensayos de actividad y espectroscopia de masas.

Ejemplo 15

Dominio de proteasa de u-PA modificado y evaluación farmacocinética de proteína de fusión de u-PA-HSA modificada después de la inyección intravítrea

Se evaluó la farmacocinética y toxicidad ocular manifiesta de un polipéptido de fusión u-PA-HSA modificado. La proteína de fusión contiene un dominio de proteasa de polipéptido de u-PA modificado por ae (SEQ ID NO:987, que es SEQ ID NO:21, excepto que el C122S es C122C), como se describió anteriormente en el Ejemplo 14. La proteína de fusión tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO:1019, que son residuos 21-1022 de SEQ ID NO:1015. Como se describe en el Ejemplo 14, el dominio de proteasa del u-PA modificado se expone en SEQ ID NO:987. El perfil farmacocinético de proteínas de fusión u-PA-HSA modificadas activadas e inhibidas (SEQ ID NO:1015) se evaluó *in vivo* en conejos con cinturón holandés y se comparó con el perfil farmacocinético del dominio de proteasa de u-PA modificado solo como se expone en SEQ ID NO:21. Se asignaron ocho conejos a cada uno de tres grupos de tratamiento (grupo 1: u-PA-HSAa modificado; grupo 2: u-PA-HSAi modificado; grupo 3: dominio de proteasa de u-PA modificado (SEQ ID NO: 21)). A los animales de estudio se les administraron 50 µL de 2.1 mg/mL de u-PA-HSAi modificado y u-PA-HSAa, o 1.15 mg/mL de u-PA modificado (SEQ ID NO: 21), por ojo, mediante inyección intravítrea (IVT). Para el grupo tratado con el u-PA modificado que contiene la proteasa modificada, el ojo derecho recibió el polipéptido de u-PA modificado y el ojo izquierdo se inyectó con PBS como el control del vehículo (PBS). La tabla posterior resume los grupos y condiciones, y las evaluaciones realizadas:

Grupo	**Formula-ción**	**Concen-tración (mg/mL)**	**Dosis/ Ruta**	**Método de puntuación de irritación/ tiempo**	**Terminal Puntos de tiempo**	**Fluidos y tejidos recolectados (OS y OD)***
1 (n=8)	u-PA-HSA modificado Activado (u-PA-HSAa)	2.1 mg/mL	50 µL/ojo intra-vítreo	Draize/antes de la eutanasia	1, 3, 7 y 14 días después de la dosis (n =2/ punto de tiempo)	Humor acuoso, humor vítreo, retina, coroides, plasma
2 (n=8)	u-PA-HSA modificado Inhibido (u-PA-HSAi)	2.1 mg/mL	50 µL/ojo intra-vítreo	Draize/antes de la eutanasia	1, 3, 7 y 14 días después de la dosis (n =2/ punto de tiempo)	Humor acuoso, humor vítreo, retina, coroides, plasma

3 (n=8)	Dominio de proteasa de u-PA modificado (SEQ ID NO: 21)	1.15 mg/mL	50 µL ojo izquierdo/ intra-vítrea Ojo derecho/ control	Draize/antes de la eutanasia	1, 3 y 7 días después de la dosis (n =2-3/ punto de tiempo)	Humor acuoso, humor vítreo, retina, coroides, plasma

* OS y OD se refieren a los ojos derecho e izquierdo, respectivamente

1. Tolerabilidad ocular de proteína de fusión de u-PA modificada y u-PA-HSA modificada

Durante el período de dosificación y antes de la eutanasia, se realizaron observaciones clínicas y oculares y se registraron el peso corporal. Se realizaron exámenes oculares en ambos ojos a los 1, 3, 7 y 14 días (Grupos 1 y 2) o a los 1, 3 y 7 días (Grupo 3) después de la dosificación, y la irritación ocular se calificó utilizando la escala de Draize. El sistema de puntuación Draize (Draize *et al*., (1944) *J Pharm Exper Ther* 82 (3) 377-90) evalúa la irritación ocular en la córnea, el iris y la conjuntiva y proporciona criterios para puntuar la irritación en una escala de 0-2 o 0-4. Una puntuación de “0” indica que la córnea, el iris o la conjuntiva es normal. En todos los momentos, la irritación ocular obtuvo una puntuación de 0 según se evaluó utilizando los criterios de Draize para todos los animales, excepto un conejo con 2 puntuaciones de “1” que indican “enrojecimiento” donde los “vasos se inyectan definitivamente por encima de lo normal” y “quimiosis” con “hinchazón por encima de lo normal” de la conjuntiva. Estas puntuaciones “1” se observaron para un conejo en el Grupo 2 (u-PA-HSAi) dentro de unas pocas horas después de la administración intravítrea de u-PA-HSAi en el día 1. Lo más importante es que no se observó toxicidad después de la administración intravítrea de las proteínas de fusión activadas u-PA y u-PA-HSA modificadas.

2. Farmacocinética de proteína de fusión de u-PA modificada y u-PA-HSA modificada

Para la determinación de las concentraciones de polipéptido de u-PA modificado y u-PA-HSA modificado (nM) y los parámetros farmacocinéticos, se recogieron muestras terminales de tejidos oculares y fluidos después de la enucleación de ambos ojos los días 1, 3, 7 y 14 utilizando dos animales por punto de tiempo. Después de la eutanasia, ambos ojos de cada conejo se recolectaron y disecaron para la recolección de tejidos oculares y fluidos (humor acuoso (AH), humor vítreo (VH), retina y coroides)) para la evaluación de la expresión y actividad de u-PA y u-PA-HSA. Después de la recolección, se homogeneizaron cantidades pesadas de humor vítreo de conejo, retina y coroides en microtubos resistentes al impacto (USA Scientific) que contienen cuentas de cerámica de 2.8 mm. Para los tejidos VH, retina y coroides, se adicionó una alícuota consistente de solución salina amortiguada con fosfato por miligramo de tejido a cada tubo. Las muestras de retina y coroides se diluyeron 9:1 (volumen diluyente: volumen de tejido) y las muestras de VH se diluyeron 4:1 (volumen diluyente: Volumen VH) con solución salina amortiguada con fosfato. Las muestras se homogeneizaron

(homogeneizador Precellys®) a 0 a 10°C, a 5500 rpm durante ciclos de 3 × 30 segundos con pausas de 20 segundos entre ciclos hasta que se homogeneizaron completamente.

La concentración determinada por ELISA (nM) y actividad (nM) de polipéptidos de u-PA modificados y u-PA-HSA modificados en VH se determinó usando un ensayo ELISA y actividad, respectivamente. Para la determinación de la concentración, el ELISA tipo sándwich anti-u-PA se llevó a cabo de la siguiente manera: el anticuerpo de captura PA1-36166 (Invitrogen) se recubrió en placas ELISA durante la noche a 4ºC o 2 horas a TA a una concentración de 1.0 ug/mL en solución amortiguadora de carbonato 100 mM, pH 9.5. Las placas se lavaron posteriormente 3X con PBST (1X PBS que contiene tween) seguido de bloqueo con BSA al 1% en PBS-tween durante la noche a 4ºC o 2 horas a TA. Se incubaron 50 µL de cada muestra durante 30 minutos a TA con agitación seguido de lavado 3x con PBS e incubación con el anticuerpo de detección PA1-36015 (Invitrogen a 0.25 ug/mL durante 30 minutos). Los pocillos se lavaron nuevamente y posteriormente se incubaron con anticuerpo anti-cabra conjugado con HRP (Rockland) a dilución 1:30000 durante 30 min con agitación a TA. Después de lavar 6X con PBST, los polipéptidos de u-PA modificados unidos y u-PA-HSA modificados se visualizaron mediante detección con TMB de 1 paso (34028, Thermo), inactivación con ácido sulfúrico 2N antes de leer la absorbancia a 450nm.

La cuantificación de los polipéptidos de u-PA modificados y u-PA-HSA modificados en VH por actividad se siguió usando un ensayo basado en la hidrólisis de un sustrato peptídico de fluorescencia inactivada (FRET) y se calibraron a una curva estándar de polipéptidos de u-PA modificados de concentración activa conocida. Este ensayo utiliza un sustrato peptídico de FRET basado en la secuencia de escisión del complemento humano 3 (C3). La secuencia del péptido es RQHAR/ASHL, donde el “/” indica el sitio de escisión. El lado del extremo N del péptido se etiqueta con un fluoróforo DABCYL y el lado del extremo C se etiqueta con un fluoróforo EDANS. La escisión del péptido separa el par de FRET EDANS/DABCYL para generar una señal fluorescente, que se mide en un lector de placas de fluorescencia de múltiples pocillos.

El ensayo se realizó de la siguiente manera: las muestras de prueba se diluyen habitualmente a una dilución mínima requerida de 1:20 en solución amortiguadora de ensayo (Tris 100 mM, NaCl 50 mM, Tween-80 0.01%, pH 7.4). Las muestras diluidas se diluyen adicionalmente 1:2 con sustrato de FRET 80 µM en una placa de 96 pocillos. Inmediatamente después de la combinación de muestras de prueba diluidas y sustrato, la señal de fluorescencia después de la hidrólisis del sustrato FRET se evaluó en un lector de placas de fluorescencia con mediciones cada 30 segundos durante 2 horas. La hidrólisis enzimática del sustrato peptídico FRET genera un producto fluorescente EDANS. La tasa de generación de

intensidad de fluorescencia se interpola contra una curva estándar EDANS para producir la tasa de generación del producto EDANS. La actividad específica se puede calcular de dos maneras. En primer lugar, la velocidad de generación del producto se multiplica por el factor de dilución para proporcionar una actividad específica volumétrica en unidades de producto nmol por minuto de reacción por mL de muestra (nmol/min/mL). La actividad específica volumétrica indica la cantidad total de enzima activa en la muestra. En segundo lugar, la actividad específica se calcula dividiendo la actividad específica volumétrica por la concentración de enzima de muestra para proporcionar una actividad específica de enzima en unidades de producto nmol por minuto de reacción por mg de enzima (nmol/min/mg). Para la prueba para determinar la concentración aparente de proteasa de muestras desconocidas (por ejemplo, muestras PK *in vivo*), la actividad específica volumétrica de la muestra (nmol/min/mL) se divide por la actividad específica enzimática del polipéptido de u-PA modificado o u-PA-HSA modificado de control (nmol/min/mg) para proporcionar la concentración aparente de proteasa en la muestra (mg/mL).

Los datos para cada ojo y animal se proporcionan en la Tabla posterior. Las concentraciones obtenidas para cada ojo se promediaron por animal. Entonces, las concentraciones de fármaco para cada animal se promediaron en cada punto de tiempo para compensar la variabilidad entre animales. Las medias en cada punto de tiempo se calcularon y presentaron en la Tabla posterior. Los datos resultantes entonces se sometieron a la siguiente metodología analítica: Primero, un enfoque de regresión semiparamétrico robusto a trozos desarrollado por Lee *et al*., (ver, Lee *et al*., (1990) *J. Lab Clin*. *Med. 115*:745-748; y Lee *et al.* (1997) “The use of robust regression techniques to obtain improved coagulation factor half-life estimates. XVI Congreso de la Sociedad Internacional para la Trombosis y Hemostasis, “Florencia, Italia) se utilizó para calcular la semivida. Es un modelo compartimental. Los datos se evaluaron utilizando el programa Demitasse, que ha sido validado y utilizado para las presentaciones de la FDA. Para los análisis del área bajo la curva de tiempo (AUC) y los otros parámetros PK, se utilizó un modelo no compartimental basado en la regla trapezoidal. Los parámetros PK se calcularon y se exponen en las tablas a continuación.

Tabla

Condición	**punto de tiempo (d)**	**Concentración de fármaco por ELISA (nM)**	**Concentración de fármacos por actividad (nM)**
U-PA-HSAi modificado	0	842.90	n.d.
	1	385.08	n.d.
	1	**122.79**	**n.d.**

Condición	punto de tiempo (d)	Concentración de fármaco por ELISA (nM)	Concentración de fármacos por actividad (nM)
	1	289.90	n.d.
	1	270.36	n.d.
	3	289.25	n.d.
	3	257.84	n.d.
	3	254.54	n.d.
	3	265.59	n.d.
	7	120.94	n.d.
	7	138.35	n.d.
	7	144.15	n.d.
	7	113.22	n.d.
	14	30.13	n.d.
	14	27.53	n.d.
	14	36.28	n.d.
	14	25.37	n.d.
u-PA-HSAa modificado	0	842.90	842.90
	1	368.35	749.14
	1	264.23	344.78
	1	311.69	460.72
	1	**<LOD**	**0.35**
	3	199.27	505.84
	3	168.21	283.60
	3	132.80	179.47
	3	181.28	239.77
	7	64.47	156.92
	7	61.08	82.45
	7	73.70	98.58
	7	51.94	51.25
	14	9.69	31.96
	14	7.55	72.49
	14	5.35	15.63
	14	6.79	10.38
u-PA modificado (SEQ ID NO: 21)	0	1838.69	1838.69
	1	214.47	203.44
	1	222.15	251.46
	1	182.63	183.70
	3	**<LOD**	**6.48**
	3	130.01	110.85
	3	98.91	75.91
	7	21.55	25.24

Condición	punto de tiempo (d)	Concentración de fármaco por ELISA (nM)	Concentración de fármacos por actividad (nM)
	7	31.49	19.44

*Las células en negrita estaban fuera de los límites de detección y/o se consideraron atípicas o se excluyeron con base en una prueba atípica

Tabla

Día de estudio	U-PA-HSAi modificado (ELISA)	U-PA-HSAa modificado (ELISA)	U-PA modificado (ELISA)
1	267.03	314.76	206.42
3	266.81	170.39	114.46
7	129.16	62.80	26.52
14	29.83	7.35	n/a
Día de estudio	**U-PA-HSAi modificado (Actividad)**	**U-PA-HSAa modificado (Actividad)**	**U-PA modificado (Actividad)**
1	n.d.	388.75	212.86
3	n.d.	302.17	64.41
7	n.d.	97.30	22.34
14	n.d.	32.61	n/a

Artículo de prueba	Resultados de ELISA (t-half terminal-días)	Resultados de la actividad (t-half terminal-días)
U-PA-HSAi modificado	3.42 (MRT = 5.56)	n.d.
u-PA-HSAa modificado	2.42 (MRT = 3.79)	3.27 (MRT = 4.71)
u-PA modificado (SEQ ID NO: 21)	2.01 (MRT = 3.29)	1.95 (MRT = 3.01)

Con base en ELISA y ensayos de actividad, el dominio de proteasa modificado de u-PA (que contiene el polipéptido de u-PA modificado de SEQ ID NO:21) tiene una semivida de aproximadamente 2 días. Fusión a HSA, aumenta la semivida de la proteína. El u-PA-HSAa modificado activado tuvo una semivida de 2.42 días y 3.27 días, según lo medido por ELISA y actividad, respectivamente. Se aumentó la semivida para u-PA-HSA sometido al protocolo de inhibición con una semivida determinada por ELISA de 3.42 días. Por lo tanto, la fusión de u-PA a HSA aumenta la semivida de proteína *in vivo*, y la proteína de fusión retiene la actividad de proteasa *in vivo.*

Ejemplo 16

Clonación, Expresión y Preparación de Proteínas de Fusión u-PA

A. Clonación de polipéptidos de fusión de u-PA

Las proteínas de fusión de u-PA se generaron con compañeros de fusión en el extremo N-terminal o extremo C-terminal.

1. Proteínas de fusión de ejemplo

Se generaron varias construcciones alternativas para la expresión de proteínas de fusión u-PA (descritas a continuación). Por ejemplo, se generaron proteínas de fusión de extremo N (*ver, por ejemplo,* Figura 2A). Las construcciones contuvieron (del extremo N-terminal al extremo C-terminal): (1) una señal de secreción (*por ejemplo,* región V-III de cadena kappa de Ig de ratón (IgGκ) (SEQ ID NO: 999); (2) un compañero de fusión (*por ejemplo*, IgG1 Fc (SEQ ID NO: 992)); (3) ligador, tal como AGS (SEQ ID NO: 1003); a la secuencia de activación de u-PA tipo silvestre (SEQ ID NO: 997; aminoácidos 167-178 de SEQ ID NO: 1); y (5) el dominio de proteasa de u-PA modificado (SEQ ID NO: 987). Un ejemplo de una proteína de fusión N-terminal se expone en SEQ ID NO: 1004.

También se generaron proteínas de fusión de extremo C (*ver, por ejemplo,* Figura 3). En algunos ejemplos, las construcciones contuvieron (del extremo N-terminal al extremo C-terminal): (1) una señal de secreción (región V-III de cadena kappa de Ig de ratón (IgGκ) (SEQ ID NO: 999); o Interleucina-2 humana (hIL2) (SEQ ID NO: 1000)); (2) la secuencia de activación de u-PA tipo silvestre (SEQ ID NO: 997 o 998), secuencia de activación de furina (SEQ ID NO: 995, 996 o 1041), o ninguna secuencia de activación; (3) el dominio de proteasa de u-PA modificado (SEQ ID NO: 987 o 21) o el dominio de proteasa de u-PA tipo silvestre (SEQ ID NO: 2 o 5); (4) un ligador (SEQ ID NO: 1002 o 1003); y (5) un compañero de fusión (*es decir,* IgG1 Fc (SEQ ID NO: 992); albúmina sérica humana (HSA) (SEQ ID NO: 991); cFv que se une al colágeno IIm (C2scFv) (SEQ ID NO: 993); o un dominio de unión a ácido hialurónico (HABD)(SEQ ID NO: 994)). Los ejemplos de proteínas de fusión en el extremo C se exponen en SEQ ID nos: 1006-1010, 1012, 1013, 1016 y 1040 (ver, *por ejemplo*, las figuras 3A y 3B).

También se generaron proteínas de fusión C-terminal que contienen la región N-terminal u-PA. Las construcciones contuvieron (del extremo N-terminal al extremo C-terminal): (1) una señal de secreción (región V-III de cadena kappa de Ig de ratón (IgGκ); SEQ ID NO: 999); (2) la región N-terminal de u-PA tipo silvestre (aminoácidos 21-178 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 1042); (3) una secuencia de activación de u-PA (SEQ ID NO: 997 o 998) o una secuencia de activación de furina (SEQ ID NO: 995, 996 o 1041); (4) el dominio catalítico de u-PA modificado (SEQ ID NO: 987 o SEQ ID NO:5, excepto con C122, mediante numeración de quimotripsina, o SEQ ID NO: 21); (5) un ligador (SEQ ID NO: 1002 o 1003); y (6) un compañero de fusión (*es decir,* IgG1 Fc (SEQ ID NO: 992); albúmina sérica humana (HSA) (SEQ ID NO: 991)). Los ejemplos de proteínas de fusión en el extremo C se exponen en SEQ ID nos: 1011, 1014, 1015 y 1036 (ver, *por ejemplo*, Fig. 3C). Ver también SEQ ID NO:1010, que contiene una secuencia de activación de furina en lugar del u-PA

También se generaron proteínas de fusión que contienen SUMO en el extremo N-terminal y el compañero de fusión en el extremo C-terminal. Las construcciones contuvieron (del extremo N-terminal a extremo C-terminal): (1) una señal de secreción (región V-III de cadena kappa de Ig de ratón (IgGκ) (SEQ ID NO: 999)); (2) una secuencia de SUMO y ligador HIS (SEQ ID NO: 990); (3) el dominio catalítico de u-PA modificado (SEQ ID NO: 987); (4) un ligador (SEQ ID NO: 1002); y (5) un compañero de fusión (*es decir,* IgG1 Fc (SEQ ID NO: 992); o albúmina de suero humano (HSA) (SEQ ID NO: 991)). Los ejemplos de proteínas de fusión en el extremo C se exponen en SEQ ID nos: 1016 y 1017.

Se generó una proteína de u-PA de longitud completa que no se fusionó a un compañero de fusión como un control (*ver, por ejemplo,* Figura 2B). La construcción contiene (de N-terminal a C-terminal): (1) señal de secreción (región V-III de cadena kappa de Ig de ratón (IgGκ) (SEQ ID NO: 999)); (2) el dominio de extremo N de u-PA (SEQ ID NO:1040; aminoácidos 21-166 de SEQ ID NO: 1); (3) una secuencia de activación de u-PA (SEQ ID NO: 997); y (4) el dominio de proteasa de u-PA modificado (SEQ ID NO: 987). Un ejemplo de una proteína de u-PA de longitud completa se expone en SEQ ID NO: 1005. Lo siguiente es un resumen de las construcciones que se generaron:

SEQ ID NO:	**Secuencia de señal**	**Compañero de fusión**	**Secuencia de activación**	**Ubicación del compañero de fusión**	**Dominio de proteasa de u-PA**
1004	IgGκ	IgG1 Fc	u-PA con Cys	N-terminal	SEQ ID NO: 987
1005	IgGκ	Sin compañero de fusión	UPA de longitud completa con Cys	Sin compañero de fusión	SEQ ID NO: 987
1006	hIL2	IgG1 Fc	Sin secuencia de activación	C- terminal	SEQ ID NO: 21
1007	hIL2	HSA	Sin secuencia de activación	C- terminal	SEQ ID NO: 21
1008	hIL2	C2 scFv	Sin secuencia de activación	C- terminal	SEQ ID NO: 21
1009	hIL2	HABD	Sin secuencia de activación	C- terminal	SEQ ID NO: 21
1010	IgGκ	IgG1Fc	furina u-PA sin Cys	C- terminal	SEQ ID NO: 21
1011	IgGκ	IgG1Fc	UPA tipo silvestre de longitud completa con Cys	C- terminal	SEQ ID NO: 987
1012	hIL2	IgG1 Fc	Sin secuencia de activación	C- terminal	SEQ ID NO: 5
1013	hIL2	HSA	Sin secuencia de activación	C- terminal	SEQ ID NO: 5

SEQ ID NO:	Secuencia de señal	Compañero de fusión	Secuencia de activación	Ubicación del compañero de fusión	Dominio de proteasa de u-PA
1014	IgGκ	HSA	furina con Cys	C- terminal	SEQ ID NO: 987
1015	IgGκ	HSA	u-PA con Cys	C- terminal	SEQ ID NO: 987
1016	IgGκ	HSA	furina sin Cys	C- terminal	SEQ ID NO: 21
1017	IgGκ	HSA	SUMO	C- terminal	SEQ ID NO: 21
1018	IgGκ	IgG1 Fc	SUMO	C- terminal	SEQ ID NO: 21

La proteína de control tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1005. La proteína de control contiene el extremo N de u-PA (residuos 1-158 de la SEQ ID NO:3), secuencia de activación de u-PA tipo silvestre y dominio de proteasa de u-PA (SEQ ID NO:987) y ningún compañero de fusión. La proteína de fusión expuesta en SEQ ID NO: 1004 incluye el compañero de fusión (Fc) en el extremo N. Las proteínas de fusión expuestas en SEQ ID nos: 1006-1009 tienen diferentes compañeros de fusión en el extremo C-terminal y carecen de una secuencia de activación N-terminal al dominio de proteasa de u-PA modificado. Las proteínas de fusión expuestas en SEQ ID nos: 1010 y 1011 contienen Fc en el extremo C y se activan de manera diferente entre sí: la proteína de fusión expuesta en SEQ ID NO: 1010 contiene una secuencia de activación de furina; y la proteína de fusión expuesta en SEQ ID NO: 1011 contiene la región n-terminal de u-PA y una secuencia de activación de u-PA tipo silvestre. Las proteínas de fusión expuestas en SEQ ID nos: 1012 y 1013 son los mismos que las proteínas de fusión expuestas en SEQ ID nos: 1006 y 1007, respectivamente, pero tienen el dominio de proteasa de u-PA tipo silvestre en lugar del dominio de proteasa de u-PA modificado.

Las proteínas de fusión expuestas en SEQ ID nos: 1014-1016 contienen HSA en el extremo C y se activan de manera diferente entre sí: la proteína de fusión expuesta en SEQ ID NO: 1014 contiene una secuencia de activación de furina; la proteína de fusión expuesta en SEQ ID NO: 1015 contiene una secuencia de activación de u-PA tipo silvestre para activación; y la proteína de fusión expuesta en SEQ ID NO: 1016 contiene un dominio de furina para activación. Las proteínas de fusión expuestas en SEQ ID nos: 1017 y 1018 contienen SUMO como un dominio de activación en el extremo N-terminal y HSA o IgG-Fc en el extremo C-terminal, respectivamente. Se adicionaron sitios de activación de furina a las proteínas de fusión expuestas en SEQ ID nos: 1010, 1014 y 1016 de modo que la proteína pueda activarse durante la expresión, eliminando así un requisito para un paso de activación durante el procesamiento posterior.

2. Generación de construcción

(a) Preparación de construcciones de u-PA

Las construcciones se ensamblaron a partir de oligonucleótidos sintéticos y/o productos de PCR y se clonaron en el vector pcDNA3.4-TOPO (Invitrogen; Cat. No. A14697) para la expresión bajo control del promotor/potenciador temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMV).

b) Preparación de construcciones SUMO-u-PA

Para la expresión de proteínas de fusión que contienen una etiqueta SUMO (expuesta en SEQ ID nos: 1017 y 1018), el ADN que codifica para el polipéptido de u-PA modificado con C122S (expuesta en SEQ ID NO: 21) se clonó en el vector de expresión pE5 optimizado por codones (Thermo Scientific; secuencia expuesta en SEQ ID NO:988). El plásmido pE5 contiene un sitio de clonación múltiple C-terminal a una secuencia de SUMO para clonar el compañero de fusión (HSA o F_c) y el dominio de proteasa de u-PA modificado. La proteína de fusión final es (1) un compañero de fusión (HSA o FC); (2) el dominio de proteasa de u-PA modificado con C122S (SEQ ID NO: 21); con una (3) etiqueta de purificación 6xHis N-terminal; y (4) SUMO.

B. Preparación de polipéptidos de fusión u-PA

Los pesos moleculares esperados de las proteínas de fusión de u-PA se exponen a continuación:

		MW esperados reducidos	
Nombre	**MW esperados no reducidos**	**MW con activación**	**MW sin activación**
1004	111012	u-PA modificado: 28445.36 Fc: 27078.73	55506.07
1005	46389	u-PA modificado: 28445.36 uPA: 17961.36	46388.7
1006	108467	54233.44	
1007	95286	95285.85	
1008	55226	55226	
1009	40297	40297	
1010	111146	54233.44	55573
1011	144386	uPA: 17961.36 u-PA -Fc modificado: 54249.50	72192.85
1012	108461	54230.5	
1013	95283	95282.91	

1. Transformación, expresión, plegado y replegado de proteínas de fusión de u-PA

Proteínas de fusión con las secuencias expuestas en SEQ ID nos: 1004-1013 se transformaron y se expresaron como se detalla en el Ejemplo 14 anterior.

2. Transformación, expresión, plegado y replegado de proteínas de fusión u-PA-SUMO (pequeño modificador tipo ubiquitina)

Proteínas de fusión con las secuencias expuestas en SEQ ID nos: 1017 y 1018 se prepararon como se detalla a continuación.

Clonación del polipéptido de fusión u-PA modificado por SUMO para la expresión de *E. coli*

Las células competentes de *E. coli* BL21 Gold (DE3) se transforman con proteína de fusión u-PA en un vector de expresión (SEQ ID NO: 988), que fue preparado por Thermo Scientific, usando el método de choque térmico estándar. El ADN del plásmido se resuspende en 50 µL de agua MQ para obtener una solución madre de 100 ng/mL. El ADN del plásmido y las células BL21 Gold DE3 competentes se descongelan en hielo. 0.5 µL de ADN se adicionan a células de 50 µL en un tubo de microfugo estéril y se incuban en hielo durante 30 minutos. La mezcla de célula/ADN se somete a choque térmico al colocarse a 42ºC durante 45 segundos. La mezcla de célula/ADN se transfiere inmediatamente de vuelta a hielo y se incuba en hielo durante 2 minutos. Se adicionan 450 µL de medio SOC precalentado (37°C) a la mezcla de célula/ADN, y la mezcla de SOC/ célula/ADN resultante se incuba a 37°C con agitación. Las células en SOC (2-200 µL) se colocan en placas y se esparcen en placas de LB-carbenicilina, que se incuban durante la noche a 37°C. Las placas que albergan colonias bacterianas se retiran de la incubadora, se sellan con parafilm y se almacenan a 4 °C. Las reservas de glicerol de colonias transformadas individuales se preparan mediante métodos estándar y se almacenan a -70 °C.

C. Evaluación de la expresión proteica de proteínas de fusión en cultivos celulares de mamíferos

La concentración de proteína del sobrenadante de cultivo celular expi293 (ver Ejemplo 14) se evaluó por ELISA y cualitativamente por transferencia Western. La expresión de proteína después de la transferencia Western se puntuó en una escala de 1 a 5 donde 1 representa la expresión más alta y 5 representa ninguna expresión.

Se probaron seis muestras para cada construcción. Los resultados se exponen en las tablas a continuación. Los resultados muestran que mediante ELISA y Western Blotting de las proteínas de fusión expuestas en SEQ ID nos: 1004, 1007-1009 y 1013 se expresaron mal. Las proteínas expuestas en SEQ ID nos: 1005, 1010 y 1011 tuvieron la expresión más alta como se evaluó mediante transferencia Western cualitativa y ELISA.

Tabla: Expresión de proteína evaluada por ELISA

Muestra SEQ ID	Título ELISA (mg/L)	ELISA u-PA (mg/L)
1004	0.4	0.4

Tabla: Expresión de proteína evaluada por ELISA		
Muestra SEQ ID	**Título ELISA (mg/L)**	**ELISA u-PA (mg/L)**
1005	75.39	149.7
1006	2.2	2.6
1007	0.3	0.3
1008	0.06	0.1
1009	0.26	0.3
1010	15.89	17.3
1011	21.66	19.3
1012	7.5	16.2
1013	5.46	4.7

R al cuadrado =0.9993; límite de detección=0.109 ng/mL; límite de cuantificación=1.375 ng/mL

Tabla: Expresión de proteína evaluada mediante transferencia Western	
SEQ ID NO:	**SDS-PAGE / Clasificación Western**
1004	4
1005	1
1006	3
1007	3
1008	5
1009	5
1010	1
1011	1
1012	3
1013	4

D. Estrategias de activación de la proteína de fusión

Se emplearon varias estrategias para la activación de u-PA. Las proteínas expuestas en SEQ ID nos: 1004-1005, 1011 y 1015 se activaron mediante plasmina, como se detalló anteriormente en el Ejemplo 14. Las proteínas expuestas en SEQ ID nos: Se esperaba que 1010, 1014 y 1016 se activaran mediante furina intracelular durante la expresión. La proteína expuesta en SEQ ID NO: Se previó que 1006-1008 se activaría automáticamente durante la expresión. Las proteínas expuestas en SEQ ID nos: 1017 y 1018 se activaron mediante tratamiento DE SUMO proteasa. Para activar las construcciones SUMO-u-PA, habitualmente se adicionaron 10 Unidades de SUMO proteasa por 1 mg de proteína y se dejó incubar durante la noche a 4ºC. La purificación adicional en una columna de quelación de níquel HisTrap eliminaría eficazmente el resto DE SUMO marcado con HisTrap.

SEQ ID NO:	**Secuencia de activación**	**Estrategia de activación**
1004	peso uPA con Cys	Tratamiento con plasmina
1005	UPA de longitud completa con Cys	Tratamiento con plasmina
1006	Sin secuencia de activación	La escisión de la señal de secreción durante la expresión genera proteasa activada
1007	Sin secuencia de	La escisión de la señal de secreción durante la

SEQ ID NO:	Secuencia de activación	Estrategia de activación
	activación	expresión genera proteasa activada
1008	Sin secuencia de activación	La escisión de la señal de secreción durante la expresión genera proteasa activada
1009	Secuencia de activación C3	Secuencia C3 autoactivada después de la expresión
1010	Furina uPA sin Cys	Activación de furina durante la expresión; no es necesaria la activación durante el procesamiento posterior
1011	uPA TS de longitud completa con Cys	Tratamiento con plasmina
1012	Sin secuencia de activación	La escisión de la señal de secreción durante la expresión genera proteasa activada
1013	Sin secuencia de activación	La escisión de la señal de secreción durante la expresión genera proteasa activada
1014	Furina con Cys	Activación intracelular por Furina durante la expresión; activación no necesaria durante el procesamiento subsecuente
1015	uPA con Cys	Tratamiento con plasmina
1016	Furin sin Cys	Activación intracelular por Furina durante la expresión; activación no necesaria durante el procesamiento subsecuente
1017	SUMO	Tratamiento de proteasa SUMO
1018	SUMO	Tratamiento de proteasa SUMO

E. Medición de la actividad de enzima

Se evaluó la actividad específica del volumen de sobrenadantes HEK expi293 que contienen las proteínas de fusión u-PA en péptido de FRET C3 humano 40 µM como se describe en el Ejemplo 15. Se calculó la velocidad inicial interpolada ajustada por dilución (muestra de nM EDANS/min/µL). Proteínas de fusión expuestas en SEQ ID nos: 1004, 1005, 1008 y 1011-1013 no mostraron actividad. Proteínas de fusión expuestas en SEQ ID nos: 1006, 1007, 1009 y 1010 demostraron actividad de proteasa u-PA. u-PA modificada con una secuencia de activación de Furin N-terminal a u-PA con una fusión de Ig FC en el extremo C (expuesta en SEQ ID NO: 1010) mostraron la actividad más alta. Los resultados se exponen en la tabla posterior.

SEQ ID NO.	Actividad (nM EDANS/min/µL muestra)	Se puede activar automáticamente	Sin actividad en el ratón C3
1004	-0.1		
1005	-0.1		
1006	3.7	X	X
1007	3.2	X	X
1008	0.3	X	
1009	2.7	X	
1010	56.0	X	

SEQ ID NO.	Actividad (nM EDANS/min/µL muestra)	Se puede activar automáticamente	Sin actividad en el ratón C3
1011	-0.1		
1012	0.0	X	
1013	0.1	X	

F. Purificación de Afinidad

Las proteínas de fusión expuestas en SEQ ID nos: 1010 y 1011 tuvieron la mayor expresión como se evaluó mediante transferencia Western y ELISA. Las proteínas de fusión u-PA-Fc variantes de furina y uPA-Fc de longitud completa expuestas en SEQ ID nos: 1010 y 1011, respectivamente, se purificaron por afinidad a proteína A usando las condiciones recomendadas por el fabricante (GE Healthcare).

G. Purificación y evaluación de actividad de proteínas de fusión de alta expresión

Después de la purificación de afinidad, las concentraciones de proteína se evaluaron mediante absorbancia a 280 nm y mediante ELISA u-PA (ver Ejemplo 15), mientras que la pureza se evaluó mediante electroforesis en gel SDS-PAGE y cromatografía de exclusión por tamaño analítico (SEG), como se describió anteriormente en el Ejemplo 14. Se expresaron ambas proteínas de fusión. La pureza, cuando se evaluó mediante electroforesis en gel y tinción, y mediante cromatografía de exclusión de tamaño analítico (SEG), se consideró pobre para la proteína de fusión cuya secuencia se expone en SEQ ID NO: 1010 (u-PA Furina sin Cys). La pureza mediante electroforesis en gel se consideró buena para la proteína de fusión expuesta en SEQ ID NO: 1011 (uPA TS de longitud completa con Cys). Los resultados se exponen en la tabla posterior:

SEQ ID NO.	Columna	Volumen total (mL)	Concentración (mg/mL)		Rendimiento total de proteína (mg)		Pureza por gel	Pureza por SEC
			A280	ELISA	A280	ELISA		
1010	ProA	8.6	4.23	0.60	36.38	5.19	Pobre	Pobre
1011	ProA	13.6	1.69	1.04	22.98	14.09	Buena	Pobre

La actividad de enzima de u-PA después de la purificación por afinidad se evaluó en el ensayo de péptido de FRET de C3 humana como se describió anteriormente en el Ejemplo 15. Los resultados se exponen en la tabla posterior:

SEQ ID NO.	Actividad específica volumétrica	A280: Actividad específica de enzima	A280: Actividad relativa a	ELISA: Actividad específica de	ELISA: Actividad relativa al

	(nmol/min/mL)	(nmol/min/mg)	u-PA SEQ ID NO:21	enzima (nmol/min/mg)	dominio de proteasa de u-PA variante (SEQ ID NO 21)
1010	466.81	110.36	2%	773.05	45%
1011	0.10	0.06	0%	0.10	0%

La actividad de enzima u-PA después de la purificación por afinidad se evaluó en el ensayo de péptido de FRET de C3 humana como se describió anteriormente en el Ejemplo 15. La actividad de enzima se evaluó después de la activación de plasmina como se describió anteriormente en el Ejemplo 14. Los resultados se exponen en la tabla posterior:

SEQ ID NO.	Actividad específica volumétrica (nmol/min/mL)	A280: Actividad específica de enzima (nmol/min/mg)	A280: Actividad relativa a u-PA SEQ ID NO:21	ELISA: Actividad específica de enzima (nmol/min/mg)	ELISA: Actividad relativa al dominio de proteasa de u-PA variante (SEQ ID NO 21)
1010	466.81	110.36	2%	773.05	45%
1011	0.10	0.06	0%	0.10	0%

H. Descripción de proteínas de fusión con polipéptidos de u-PA modificados que escinden C3

Posteriormente se describen proteínas de fusión con polipéptidos de u-PA. Las secuencias de ejemplo se proporcionan en la siguiente discusión.

1. Dominios catalíticos

El dominio catalítico (dominio de proteasa) puede ser cualquiera de los dominios de proteasa de los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente (ver el Ejemplo 2, Tabla 14, que proporciona el ED_{50} para dominios de proteasa que contienen diversas modificaciones como se describe en la presente y en los Ejemplos), particularmente cualquiera con un ED_{50} menor que 100 nM, como se describe en el Ejemplo 2, o menor que 50 nM, 30 nM o 10 nM. Ejemplo del dominio de proteasa uPA modificado es el expuesto en SEQ ID NO:21, excepto, cuando se usa para activarse para producir un polipéptido de dos

cadenas, el residuo 122 (por numeración de quimotripsina) es C, no S como en SEQ ID NO:21.

Tab Los dominios de proteasa de polipéptido uPA modificados:

SEQ ID NO: 987: IIGGEFTTIE NQPWFAAIYQ RYEGGSEYYR CGGSLISPCWVISATHCFIP QPKKEDYIVY LGRSRLNSNT QGEMKFEVEN LILHKDYSAD IAAQHNDIALLKIRSKEGRC AQPSRTIQTI CLPSMYNDPQ FGTSCEITGF GKENSTDRLY PEQLKMTVVKLISHRECQQP HYYGSEVTTK MLCAADPQWK TDSCQGDSGG PLVCSLQGRM LTGIVSWGRGCALKDKPGV YTRVSHFLPW IRSHTKEENG LAL;

SEQ ID NO: dominio de proteasa de polipéptido uPA modificado que contiene una mutación C122S: IIGGEFTTIENQPWFAAIYQRY EGGSEYYRCG GSLISPCWVI SATHCFIPQP KKEDYIVYLG RSRLNSNTQGEMKFEVENLI LHKDYSADIA AQHNDIALLK IRSKEGRCAQ PSRTIQTI**S**L PSMYNDPQFGTSCEITGFGK ENSTDRLYPE QLKMTVVKLI SHRECQQPHY YGSEVTTKML CAADPQWKTDSCQGDSGGPL VCSLQGRMTL TGIVSWGRGC ALKDKPGVYT RVSHFLPWIR SHTKEENGLAL

contienen reemplazos de aminoácidos en comparación con el dominio de proteasa de polipéptido de uPA nativo SEQ ID NO: 2:

IIGGEFTTIE NQPWFAAIYR RHRGGSVTYV CGGSL[**I/M**]SPCWVISATHCFID YPKKEDYIVY LGRSRLNSNT QGEMKFEVEN LILHKDYSAD TLAHHNDIALLKIRSKEGRC AQPSRTIQTI CLPSMYNDPQ FGTSCEITGF GKENSTDYLY PEQLKMTVVKLISHRECQQP HYYGSEVTTK MLCAADPQWK TDSCQGDSGG PLVCSLQGRM TLTGIVSWGRGCALKDKPGV YTRVSHFLPW IRSHTKEENG LAL;

o en comparación con el dominio de proteasa en el que la C en el residuo 122 (mediante numeración de quimotripsina) es S como se expone en SEQ ID NO: 5: IIGGEFTTIENQPWFAAIYRRHRGGSVTYVCGGSLISPCWVISATHCFIDYPKKEDYIVYLGRS RLNSNTQGEMKFEVENLILHKDYSADTLAHHNDIALLKIRSKEGRCAQPSRTIQTISLPSMYN DPQFGTSCEITGFGKENSTDYLYPEQLKMTVVKLISHRECQQPHYYGSEVTTKMLCAADPQ WKTDSCQGDSGGPLVCSLQGRMTLTGIVSWGRGCALKDKPGVYTRVSHFLPWIRSHTKEE NGLAL.

Como se muestra en la presente, los polipéptidos de u-PA modificados exhiben actividad proteolítica alterada y propiedades bioquímicas en comparación con el u-PA natural. Los polipéptidos de u-PA se modifican para tener mayor actividad para escindir C3, como se describe en la presente, y para tener menor actividad para escindir su sustrato natural.

2. Señales de secreción

Para garantizar la secreción extracelular del polipéptido de u-PA modificado durante la expresión de proteína, se puede incluir una señal de secreción en la construcción para dirigir la secreción del polipéptido codificado tras la expresión. Muchos de estos signos

son conocidos por aquellos expertos en la técnica. Estos incluyen la señal de u-PA nativa y otros, tal como la señal de secreción de mKLC (SEQ ID NO: 999 (METDTLLLWVLLLWVPGSTG) o la señal de secreción de IL2 humana (SEQ ID NO: 1000 (MYRMQLLSCI ALSLALVTNS) y otros ejemplificados en la presente. Las secuencias de señal generalmente ocurren en el extremo N de un polipéptido para dirigir la secreción; son eliminadas por la célula hospedadora.

3. Compañeros de fusión

Además del reemplazo, inserción o eliminación de aminoácidos, se pueden adicionar modificaciones adicionales al polipéptido uPA para crear una proteína de fusión o quimérica. Numerosos compañeros de fusión y sus propiedades son conocidos por aquellos expertos en la técnica. Estos incluyen, por ejemplo, compañeros de fusión que se pueden multimerizar, aquellos que pueden aumentar la semivida en suero y aquellos que alteran las propiedades de unión o se dirigen al polipéptido. Por ejemplo, los polipéptidos uPA modificados y naturales pueden unirse a un fragmento de anticuerpo o dominio de multimerización tal como la región Fc de una IgG1 de polipéptido de inmunoglobulina (SEQ ID NO: 992 (DKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG)) o Collagen II scFv (SEQ ID NO: 993 (QVQLQQPGADL VRPGVSVKLSCKASGYTFTS YWMNWVKQRP GQGLEWIGMI HPSDSETRLS QKFKDKATLT VDKSSSTAYMQLSSPTSEDS AVYYCARLKP GGTWFAYWGQ GTLVTVSAGG GGSGGGGSGG GGSGGSDIVLTQSPASLTVS LGQRATISCR ASKSVDSYGN SFMEWYQQKP GQPPKLLIYR ASNLESGIPARFSGSGSRTD FTLTINPVEA DDVATYYCQQ SNEDPYTFGG GTKLEIK)) to alter pharmacological properties of the u-PA polypeptides.

Para alterar las propiedades farmacológicas, los polipéptidos uPA, por ejemplo, se pueden fusionar a un ligando o polipéptido, tal como un anticuerpo, u otra proteína, tal como albúmina de suero humano (HSA; SEQ ID NO: 991): DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDV MCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECC HGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAAD FVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHEC

YAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLG KVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALE VDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFV EKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL), o un dominio de unión de ácido hialurónico (HABD), tal como TSG-6 (SEQ ID NO: 994) ERAAGVYHREA RSGKYKLTYAEAKAVCEFEG GHLATYKQLE AARKIGFHVC AAGWMAKGRV GYPIVKPGPN CGFGKTGIIDYGIRLNRSER WDAYCYNPHA KE.

Habitualmente, la actividad de proteasa u-PA permanece funcionalmente activa dentro de la proteína de fusión resultante, pero el péptido de fusión puede cambiar los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos del polipéptido de u-PA. Se pueden crear otras proteínas de fusión que contienen un polipéptido modificado con u-PA con un factor de crecimiento o un receptor para alterar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas.

4. Secuencias de activación

El polipéptido de u-PA puede producirse en una forma inactiva (zimógeno) y modificarse postraduccionalmente mediante escisión proteolítica para generar una forma madura y activada. Para ello, se incluye una secuencia de activación en el polipéptido de u-PA natural o modificado para suprimir su actividad de enzima. Después de la expresión de proteína, la escisión de la secuencia de activación produce una proteína de u-PA madura. Ejemplos de secuencias de activaciones incluyen, pero no se limitan a, la secuencia de activación u-PA tipo silvestre (SEQ ID NO: 997 (QCGQKTLRPRFK) o SEQ ID NO: 998 (QSGQKTLRPRFK)) o una secuencia de escisión de furina (SEQ ID NO: 995, 996, 1041 o 1044 (tal como QCGQKTLRRRKR, o QSGQKTLRRRKR, o QSG KTLRRKR, o QSGQKTLRRKR). Se puede mantener un enlace disulfuro entre la cisteína dentro de la secuencia de activación y la cisteína (C122 mediante numeración de quimotripsina) dentro del dominio catalítico de u-PA. Tras la escisión del sitio de activación, la molécula activada retiene un enlace covalente entre la activación del fragmento de extremo N o el dominio de extremo N completo.

5. Ligadores

Para unir el polipéptido de u-PA con otras secuencias de polipéptidos, se utiliza una secuencia corta y flexible de aminoácidos (ligador). Los ejemplos de ligadores incluyen, pero no se limitan a, GGSSGG o GGGGS o AGS (tal como los expuestos en SEQ ID NOS: 1001-1003 y 1024-1030), así como aquellos discutidos en la descripción detallada. Los enlaces más largos con concatenaciones de estas secuencias repetidas también se incluyen de modo que un ligador tenga la secuencia $(GGSSGG)_{n+1}$, donde n es 0 o un número entero entre 1 y 20. Otros ligadores se exponen en el listado de secuencias y en la descripción

detallada.

6. Otra modificación de u-PA

Otras secuencias peptídicas tal como 6x His SUMO (tal como las expuestas en SEQ ID NOS: 990 y 1031-1033 (DGHHHHHHGS LQDSEVNQEA KPEVKPEVKP ETHINLKVSD GSSEIFFKIK KTTPLRRLME AFAKRQGKEM DSL(**T**/**R**) FLYDGI (**E**/**R**) IQADQ (**T**/**A**)PED LDMEDNDIIE AHREQIGG)) se pueden adicionar para facilitar la expresión, secreción o purificación de polipéptidos de u-PA. Modificación química y postraduccional adicional al polipéptido de u-PA alterado o nativo puede incluir, pero no se limita a, una conjugación a un polímero tal como PEGilación, PASilación y sialilación para alterar las propiedades farmacodinámicas del polipéptido de u-PA.

7. Polipéptidos de u-PA modificados de ejemplo con fusiones N-terminales

Seq ID No.	Nombre	Señal de secuencia (residuos números)	Compañero de fusión (residuos números)	Ligador (residuos números)	Secuencia de activación (residuos números)	Dominio catalítico (residuos números)	Otro dominio de N terminal (residuos números)
1004	Fc-u-PA (SEQ ID NO: 987)	METDTLLLWVL LLWVPGSTG (1-20)	DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG (21-240)	AGS (247-249)	QCGQKTLRPR FK (250-261)	IIGGEFTTIENQPWFAAIYQR YEGGSEYY RCGGSLISPCWVISATHCFI PQPKKEDYIV YLGRSRLNSN TQGEMKFEVENLILHKDYS ADIAAQHNDIA LLKIRSKEGR CAQPSRTIQTICLPSMYNDP QFGTSCEITG FGKENSTDRL YPEQLKMTVVKLISHRECQ QPHYYGSEVTTKMLCAADP QW KTDSCQGDSGGPLVCSLQ GRMTLTGIVSWGRGCALKD KPG VYTRVSHFLPWIRSHTKEE N GLAL (262-514)	
1005	u-PA- u-PA N-término (SEQ ID NO: 987)	METDTLLLWVL LLWVPGSTG (1-20)	-	-	QCGQKTLRPR FK (167-178)	IIGGEFTTIENQPWFAAIYQR YEGGSEYYRCG GSLISPCWVI SATHCFIPQPKKEDYIVYLG RSRLNSNTQG EMKFEVENLI LHKDYSADIAAQHNDIALLKI RSKEGRCAQPSRTIQTICLP SMYNDPQFGTSCEITGFGK ENSTDRLYPE QLKMTVVKLISHRECQQPH YYGSEVTTKMLCAADPQW KTD SCQGDSGGPLVCSLQGRM TLTGIVSWGRGCALKDKPG VYTRVSHFLPWIRSHTKEE NGLAL **179-431**	SNELHQVPSN CDCLNGGTCV SNKYFSNIHW CNCPKKFGGQH CEIDKSKTCYEG NGHFYRGKAST DTMGRPCLPWN SATVLQQTYHA HRSDALQLGLG KHNYCRNPDNR RRPWCYVQVGL KPLVQECMVHD CADGKKPSSPP EELKF 21-166

* dominio de proteasa de u-PA de SEQ ID NO:21 (con y sin el reemplazo C122S)

La Figura 2 presenta esquemas de los polipéptidos de u-PA con fusiones en el extremo N, tal como los polipéptidos de fusión en el extremo N expuestos en SEQ ID NOS: 1004 y 1005.

8. Ejemplos de polipéptidos de u-PA modificados con fusiones C-terminal

SEQ ID No.	Nombre	Señal de secuencia (residuos números)	Dominio catalítico	Ligador (residuos números)	Secuencia de activación	Compañero de fusión	Otro dominio de N terminal
1006	uPA (SEQ ID NO: 21) - Fc (No PP)	MYRMQLLSCI ALSLALVTNS (1-20)	IIGGEFTTIENQPW FAAIYQRYEGGSE YYRCGGSLISPCW VISATHCFIPQPKK EDYIVYLGRSRLNS NTQGEMKFEVENLI LHKDYSAD IAAQHNDIAL LKIRSKEGRCAQPS RTIQTISLPSMYND PQFGTSCEITGFGK ENSTDRLYPEQLK MTVVKLISHRECQ QPHYYGSEVTTKM LCAADPQWKTDSC QGDSGGPLVCSLQ GRMTLTGIVSWGR GCALKDKPGV YTRVSHFLPW IRSHTKEENG LAL (21-273)	GGSSGG (274-279)	Ninguno	DKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDT L MISRTPEVTCVVVDVS HEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQY NSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNK ALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRD ELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQ PENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSR WQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPG (280-505)	
1007	uPA (SEQ ID NO: 21)- HSA (No PP)	MYRMQLLSCIAL SLALVTNS (1-20)	IIGGEFTTIE NQPWFAAIYQ RYEGGSEYYR CGGSLISPCW VISATHCFIP QPKKEDYIVY LGRSRLNSNT QGEMKFEVEN LILHKDYSAD IAAQHNDIAL LKIRSKEGRC AQPSRTIQTI SLPSMYNDPQ FGTSCEITGF GKENSTDRLY PEQLKMTVVKLISH RECQQP HYYGSEVTTK MLCAADPQWK TDSCQGDSGG PLVCSLQGRM TLTGIVSWGRGCA LKDKPGV YTRVSHFLPW IRSHTKEENG LAL (21-273)	GGSSGG (274-279)	Ninguno	DAHKSEVAHRFKDLG EENFKALVLIAFAQYL QQCPFEDHVKLVNEV TEFAKTCVADESAEN CDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCC AKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVD VMCTAFHDNEETFLK KYLYEIARRHPYFYAP ELLFFAKRYKAAFTEC CQAADKAACLLPKLD ELRDEGKASSAKQRL KCASLQKFGERAFKA WAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVTDLTKVHTE CCHGDLLECADDRAD LAKYICENQDSISSKL KECCEKPLLEKSHCIA EVENDEMPADLPSLA ADFVESKDVCKNYAE AKDVFLGMFL YEYARRHPDY SVVLLLRLAKTYETTL EKCCAAADPHECYAK VFDEFKPLVEEPQNLI KQNCELFEQLGEYKF QNALLVRY TKKVPQVSTP TLVEVSRNLGKVGSK CCKHPEAKRMPCAED YLSVVLNQLCVLHEKT PVSD RVTKCCTESL VNRRPCFSALEVDET YVPKEFNAETFTFHA DICTLSEKERQIKKQT ALVELVKHKPKATKE QLKAVMDDFAAFVEK CCKADDKETCFAEEG KKLVAASQA ALGL (280-864)	

SEQ ID No.	Nombre	Señal de secuencia (residuos números)	Dominio catalítico	Ligador (residuos números)	Secuencia de activación	Compañero de fusión	Otro dominio de N terminal
1008	uPA (SEQ ID NO: 21)-C2scFv (No PP)	MYRMQLLSCIALSLALVTNS (1-20)	IIGGEFTTIE NQPWFAAIYQ RYEGGSEYYR CGGSLISPCW VISATHCFIPQPKK EDYIVYLGRSRLNS NTQGEMKFEVENLI LHKDYSADIAAQHN DIALLKIRSKEGRC AQPSRTIQTI SLPSMYNDPQ FGTSCEITGFGKEN STDRLYPEQLKMT VVKLISHRECQQP HYYGSEVTTKMLC AADPQWKTDSCQ GDSGGPLVCSLQG RMTLTGIVSWGRG CALKDKPGVYTRV SHFLPWIRSHTKEE NG LAL (21-273)	GGSSGG (274-279)	Ninguno	QVQLQQPGADLVRP GVSVKLS CKASGYTFTS YWMNWVKQRPGQGL EWIGMI HPSDSETRLS QKFKDKATLTVDKSS STAYMQLSSPTSEDS AVYYCARLKPGGTWF AYWGQ GTLVTVSAGG GGSGGGGSGGGGS GGSDIVLTQSPASLTV S LGQRATISCRASKSV DSYGN SFMEWYQQKP GQPPKLLIYRASNLES GIPARFSGSGSRTD FTLTINPVEADDVATY YCQQ SNEDPYTFGG GTKLEIK (280-527)	
1009	uPA (SEQ ID NO: 21)-HABD (No PP)	MYRMQLLSCIALSLALVTNS (1-20)	IIGGEFTTIENQPW FAAIYQRYEGGSE YYRCGGSLISPCW VISATHCFIPQPKK EDYIVYLGRSRLNS NTQGEMKFEVENLI LHKDYSAD IAAQHNDIAL LKIRSKEGRC AQPSRTIQTI SLPSMYNDPQ FGTSCEITGF GKENSTDRLY PEQLKMTVVKLISH RECQQP HYYGSEVTTK MLCAADPQWK TDSCQGDSGG PLVCSLQGRM TLTGIVSWGRGCA LKDKPGV YTRVSHFLPW IRSHTKEENG LAL (21-273)	GGSSGG (274-279)	Ninguno	E RAAGVYHREA RSGKYKLTYA EAKAVCEFEG GHLATYKQLE AARKIGFHVC AAGWMAKGRV GYPIVKPGPN CGFGKTGIID YGIRLNRSER WDAYCYNPHA KE (280-382)	
1010	uPA (SEQ ID NO: 21)- Fc (Furin)	METDTLLLWVLL LWVPGSTG (1-20)	IIGGEFTTIENQPW FAAIYQRYEGGSE YYRCGGSLISPCW VISATHCFIPQPKK EDYIVYLGRSRLNS NTQGEMKFEVENLI LHKDYSADIAAQHN DIALLKIRSKEGRC AQPSRTIQTISLPS MYNDPQFGTSCEI TGFGKENSTDRLY PEQLKMTVVKLISH RECQQPHYYGSEV TTKMLCAADPQWK TDSCQGDSGGPLV CSLQGRMTLTGIVS WG RGCALKDKPG VYTRVSHFLP WIRSHTKEEN GLAL (32-284)	GGSSGG (285-290)	QSGQKTLR RK R (21-31)	DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG (291-516)	

SEQ ID No.	Nombre	Señal de secuencia (residuos números)	Dominio catalítico	Ligador (residuos números)	Secuencia de activación	Compañero de fusión	Otro dominio de N terminal
1011	uPA N-Term-uPA (SEQ ID NO: 987)- Fc	METDTLLLWVLLLWVPGSTG (1-20)	IIGGEFTTIENQPWFAAIYQRYEGGSEYYRCGGSLISPCWVISATHCFIPQPKKEDYIVYLGRSRLNSNTQGEMKFEVENLILHKDYSADIAAQHNDIALLK IRSKEGRCAQPSRTIQTICLPSMYNDPQFGTSCEITGFGKENSTDRLYPEQLKMTVVKLISHRECQQPHYYGSEVTTKMLCAADPQWKTDSCQGDSGGPLVCSLQGRMTLTGIVSWGRGCALKDKPGVYTRVSHFLPWIRSHTKEENGLA L (179-431)	GGSSGG (432-437)	QCGQ KTLRPRFK (167-178)	DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG (438-663)	SNELHQVPSNCDCL NGGTCVSNKYFSNI HW CNCPKKFGGQHCEI DKSKTCYEGNGHFY RG KASTDTMGRPCLPW NSATVLQQTYHAHR SD ALQLGLGKHNYCRN PDNRRRPWCYVQV GLKPLVQECMVHD CADGKKPSSP PEELKF (21-166)
1012	WT uPA con C122S-Fc (No PP)	MYRMQLLSCIALSLALVTNS (1-20)	IIGGEFTTIENQPW FAAIYRRHRGGSV TYVCGGSLMSPC WVISATHCFIDYPK KEDYIVYLGRSRLN SNTQGEMKFEVEN LILHKDYSADTLAH HNDIAL LKIRSKEGRCAQPS RTIQTISLPSMYND PQFGTSCEITGFGK ENSTDYLYPEQLK MTVVKLISHRECQ QPHYYGSEVTTKM LCAADPQWKTDSC QGDSGGPLVCSLQ GRMTLTGIVSWGR GCALKDKPGV YTRVSHFLPW IRSHTKEENG LAL (21-273)	GGSSGG (274-279)	Ninguno	DKTHTCPPCPAPELL GGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDV SHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQ YNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNG QPENN YKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNH YTQKS LSLSPG (280-505)	
1013	WT uPA con C122S - HSA (Sin PP)	MYRMQLLSCIALSLALVTNS (1-20)	IIGGEFTTIENQPW FAAIYRRHRGGSV TYV CGGSLMSPCW VISATHCFID YPKKEDYIVY LGRSRLNSNT QGEMKFEVEN LILHKDYSAD TLAHHNDIAL LKIRSKEGRC AQPSRTIQTI SLPSMYNDPQ FGTSCEITGF GKENSTDYLY PEQLKMTVVKLISH RECQQP HYYGSEVTTK MLCAADPQWK TDSCQGDSGG PLVCSLQGRM TLTGIVSWGRGCA LKDKPGV YTRVSHFLPW IRSHTKEENG LAL (21-273)	GGSSGG (274-279)	Ninguno	DAHKSEVAHRFKDLG EENFKALVLIAFAQYL QQCPFEDHVKLVNEV TEFAKTCVADESAEN CDKSLHTLFG DKLCTVATLR ETYGEMADCCAKQEP ERNEC FLQHKDDNPN LPRLVRPEVDVMCTA FHDNE ETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFF AKRYKAAFTECCQAA DKAACLLPKLDELRDE GKASSAKQRLKCASL QKFGERAF KAWAVARLSQ RFPKAEFAEVSKLVTD LTKVHTECCHGDLLE CADDRADLAKYICEN QDSISSKLKECCEKPL LEKSHCIA EVENDEMPAD LPSLAADFVESKDVC KNYAEAKDVFLGMFL YEYARRHPDYSVVLL LRLAKTYETTLEKCCA AADPHECYAKVFDEF KPLVEEPQNLIKQNCE LFEQLGEY KFQNALLVRY TKKVPQVSTPTLVEVS	

SEQ ID No.	Nombre	Señal de secuencia (residuos números)	Dominio catalítico	Ligador (residuos números)	Secuencia de activación	Compañero de fusión	Otro dominio de N terminal
						RNLGKVGSKCCKHPE AKRMPCAEDYLSVVL NQLCVLHEKTPVSDR VTKCCTESLVNRRPC FSALEVDETYVPKEFN AETFTFHADICTLSEK ERQIKKQTALVELVKH KPKATKEQLKAVMDD FAAFVEKCCKADDKE TCFAEE GKKLVAASQAALGL (280-864)	
1036	uPA N-term- uPA (SEQ ID NO: 987)-Fc (Furin)	METDTLLLWVLL LWVPGSTG (1-20)	IIGGEFTTIENQ PWFAAIYQRY EGGSEYYRCG GSLISPCWVISATH CFIPQPKKEDYIVY LGRSRLNSNTQGE MKFEVENLILHKDY SADIAAQHNDIALL KIRSKEGRCAQPS RTIQTICLPSMYND PQFGTSCEITGFGK ENSTDRLYPEQLK MTVVKLISHRECQ QPHYYGSEVTTKM LCAADPQWKTDSC QGDSGGPLVCSLQ GRMTLTGIVSWGR GCALKDKPGVYTR VSHFLPWIRSHTKE ENGLA L (179-431)	GGSSGG (432-437)	QCGQ KTLRRRKR (167-178)	DKTHTCPPCPAPELL GGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDV SHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQ YNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNG QPENN YKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNH YTQKS LSLSPG (438-663)	SNELHQVPSNCDCL NGGTCVSNKYFSNI HWCNCPKKFGGQ HCEIDKSKTCYEGN GHFYRGKASTDTMG RPCLPWNSATVLQQ TYHAHRSDALQLGL GKHNYCRNPDNRR RPWCYVQVGLK PLVQECMVHDCAD GKKPSSPPEELKF (21-166)
1014	uPA N-term- uPA (SEQ ID NO: 987)-HSA (Furina)	METDTLLLWVLL LWVPGSTG (1-20)	IIGGEFTTIENQ PWFAAIYQRY EGGSEYYRCG GSLISPCWVI SATHCFIPQP KKEDYIVYLGRSRL NSNTQG EMKFEVENLI LHKDYSADIA AQHNDIALLK IRSKEGRCAQ PSRTIQTICLPSMY NDPQFG TSCEITGFGK ENSTDRLYPE QLKMTVVKLI SHRECQQPHY YGSEVTTKMLCAA DPQWKTD SCQGDSGGPL VCSLQGRMTL TGIVSWGRGC ALKDKPGVYT RVSHFLPWIRSHTK EENGLA L (179-431)	GGSSGG (432-437)	QCGQ KTLRRRKR (167-178)	DAHKSEVAHRFKDLG EENFKA LVLIAFAQYL QQCPFEDHVKLVNEV TEFAK TCVADESAEN CDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCC AKQEPERNECFLQHK DDNPN LPRLVRPEVD VMCTAFHDNEETFLK KYLYEIARRHPYFYA PELLFFAKRYKAAFTE CCQA ADKAACLLPK LDELRDEGKASSAKQ RLKCASLQKFGERAF KAWAVARLSQRFPKA EFAEV SKLVTDLTKV HTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSI SSKLKECCEKPLLEKS HCIA EVENDEMPAD LPSLAADFVESKDVC KNYAEAKDVFLGMFL YEYARRHPDYSVVLL LRLAK TYETTLEKCC AAADPHECYAKVFDE FKPLVEEPQNLIKQN CELFEQLGEYKFQNA LLVRY TKKVPQVSTP TLVEVSRNLGKVGSK CCKHPEAKRMPCAED YLSVVLNQLCVLHEKT PVSD RVTKCCTESL VNRRPCFSALEVDET YVPKEFNAETFTFHA DICTLSEKERQIKKQT ALVE LVKHKPKATK	SNELHQVPSNCDCL NGGTCVSNKYFSNI HWCNCPKKFGGQ HCEIDKSKTCYEGN GHFYRGKASTDTMG RPCLPWNSATVL QQTYHAHRSDALQL GLGKHNYCRNPDN RRRPWCYVQVGLK PLVQECMVHDCAD GKKPSSPPEELKF (21-166)

SEQ ID No.	Nombre	Señal de secuencia (residuos números)	Dominio catalítico	Ligador (residuos números)	Secuencia de activación	Compañero de fusión	Otro dominio de N terminal
						EQLKAVMDDFAAFVE KCCKADDKETCFAEE GKKLVAASQA ALGL (438-1022)	
1015	uPA N-term- uPA (SEQ ID NO: 987)-HSA	METDTLLLWVLL LWVPGSTG (1-20)	IIGGEFTTIENQ PWFAAIYQRY EGGSEYYRCG GSLISPCWVI SATHCFIPQP KKEDYIVYLGRSRL NSNTQG EMKFEVENLI LHKDYSADIA AQHNDIALLK IRSKEGRCAQ PSRTIQTICLPSMY NDPQFG TSCEITGFGK ENSTDRLYPE QLKMTVVKLI SHRECQQPHY YGSEVTTKMLCAA DPQWKTD SCQGDSGGPL VCSLQGRMTL TGIVSWGRGC ALKDKPGVYT RVSHFLPWIRSHTK EENGLA L 179-431	GGSSGG (432-437)	QCGQ KTLRPRFK (167-178)	DAHKSEVAHRFKDLG EENFKALVLIAFAQYL QQCPFEDHVKLVNEV TEFAKTCVADESAEN CDKSLHTLFG DKLCTVATLR ETYGEMADCCAKQEP ERNEC FLQHKDDNPN LPRLVRPEVDVMCTA FHDNE ETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFF AKRY KAAFTECCQA ADKAACLLPKLDELRD EGKA SSAKQRLKCA SLQKFGERAFKAWAV ARLSQ RFPKAEFAEV SKLVTDLTKVHTECC HGDLL ECADDRADLA KYICENQDSISSKLKE CCEKPLLEKSHCIAEV ENDEMPAD LPSLAADFVE SKDVCKNYAEAKDVF LGMFL YEYARRHPDY SVVLLLRLAKTYETTL EKCC AAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQN LIKQNCELFEQLGEYK FQNALLVRYTKKVPQ VSTPTLVEVSRNLGK VGSKCCKHPEAKRMP CAED YLSVVLNQLCVLHEKT PVSD RVTKCCTESL VNRRPCFSALEVDET YVPKEFNAETFTFHA DICTLSEKERQIKKQT ALVELVKHKPKATKE QLKAVMDDFAAFVEK CCKADDKETCFAEEG KKLVAASQA ALGL (438-1022)	SNELHQVPSN CDCLNGGTCV SNKYFSNIHW CNCPKKFGGQ HCEIDKSKTC YEGNGHFYRG KASTDTMGRP CLPWNSATVL QQTYHAHRSD ALQLGLGKHN YCRNPDNRRR PWCYVQVGLK PLVQECMVHD CADGKKPSSP PEELKF (21-166)

SEQ ID No.	Nombre	Señal de secuencia (residuos números)	Dominio catalítico	Ligador (residuos números)	Secuencia de activación	Compañero de fusión	Otro dominio de N terminal
1016	uPA (SEQ ID NO: 21)-HSA (Furina)	METDTLLLWVLL LWVPGSTG (1-20)	IIGGEFTTI ENQPWFAAIY QRYEGGSEYY RCGGSLISPC WVISATHCFI PQPKKEDYIV YLGRSRLNSN TQGEMKFEVE NLILHKDYSADIAA QHNDIA LLKIRSKEGRCAQP SRTIQT ISLPSMYNDP QFGTSCEITG FGKENSTDRL YPEQLKMTVV KLISHRECQQ PHYYGSEVTT KMLCAADPQW KTDSCQGDSGGPL VCSLQGRMTLTGIV SWG RGCALKDKPG VYTRVSHFLP WIRSHTKEEN GLAL **33-285**	GGSSGG (286-291)	QSGQKTLR RRKR (21-32)	DAHKSEVAHRFKDLG EENFKALVLIAFAQYL QQCPFEDHVKLVNEV TEFAKTCVADESAEN CDKSLHTLFG DKLCTVATLR ETYGEMADCCAKQEP ERNEC FLQHKDDNPN LPRLVRPEVDVMCTA FHDNE ETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFF AKRYKAAFTECCQAA DKAACLLPKLDELRDE GKASSAKQRLKCASL QKFGERAF KAWAVARLSQ RFPKAEFAEVSKLVTD LTKVHTECCHGDLLE CADDRADLAKYICEN QDSISSKLKECCEKPL LEKSHCIA EVENDEMPAD LPSLAADFVESKDVC KNYAEAKDVFLGMFL YEYARRHPDYSVVLL LRLAKTYETTLEKCCA AADPHECYAKVFDEF KPLVEEPQNLIKQNCE LFEQLGEY KFQNALLVRY TKKVPQVSTPTLVEVS RNLG KVGSKCCKHP EAKRMPCAEDYLSVV LNQLC VLHEKTPVSD RVTKCCTESLVNRRP CFSALEVDETYVPKEF NAETFTFHADICTLSE KERQIKKQTALVELVK HKPKATKEQLKAVMD DFAAFVEKCCKADDK ETCFAEE GKKLVAASQAALGL (292-876)	
1017	SUMO-uPA (SEQ ID NO: 21)-HSA	METDTLLLWVLL LWVPGSTG (1-20)	IIGGEFTTI ENQPWFAAIY QRYEGGSEYY RCGGSLISPC WVISATHCFI PQPKKEDYIV YLGRSRLNSN TQGEMKFEVE NLILHKDYSADIAA QHNDIA LLKIRSKEGR CAQPSRTIQT ISLPSMYNDP QFGTSCEITG FGKENSTDRLYPE QLKMTVV KLISHRECQQ PHYYGSEVTT KMLCAADPQW KTDSCQGDSG GPLVCSLQGR MTLTGIVSWG RGCALKDKPG VYTRVSHFLP WIRSHTKEEN GLAL (129-381)	GGSSGG (382-387)	-	DAHKSEVAHRFKDLG EENFKALVLIAFAQYL QQCPFEDHVKLVNEV TEFAKTCVADESAEN CDKSLHTLFG DKLCTVATLR ETYGEMADCCAKQEP ERNEC FLQHKDDNPN LPRLVRPEVDVMCTA FHDNEETFLKKYLYEI ARRHPYFYAPELLFFA KRYKAAFTECCQAAD KAACLLPK LDELRDEGKA SSAKQRLKCASLQKF GERAF KAWAVARLSQ RFPKAEFAEVSKLVTD LTKV HTECCHGDLL ECADDRADLAKYICE NQDSI SSKLKECCEK PLLEKSHCIAEVENDE MPAD LPSLAADFVE SKDVCKNYAEAKDVF LGMFL YEYARRHPDY SVVLLLRLAKTYETTL EKCCAAADPHECYAK VFDEFKPLVEEPQNLI KQNCELFEQLGEYKF QNALLVRY TKKVPQVSTP TLVEVSRNLGKVGSK CCKHPEAKRMPCAED	DGHHHHHHGSLQD SEVNQEAKPEVKPE VKP ETHINLKVSDGSSEI FFKIKKTTPLRRLME AFAKRQGKEMDSLT FLYDGIEIQADQTPE D LDMEDNDII AHREQIGG (21-128)	

SEQ ID No.	Nombre	Señal de secuencia (residuos números)	Dominio catalítico	Ligador (residuos números)	Secuencia de activación	Compañero de fusión	Otro dominio de N terminal
						YLSVVLNQLCVLHEKT PVSD RVTKCCTESL VNRRPCFSALEVDET YVPKEFNAETFTFHA DICTLSEKERQIKKQT ALVELVKHKPKATKE QLKAVMDDFAAFVEK CCKADDKETCFAEEG KKLVAASQA ALGL (388-972)	
1018	SUMO-uPA (SEQ ID NO: 21)-Fc	METDTLLLWVLL LWVPGSTG (1-20)	IIGGEFTTI ENQPWFAAIY QRYEGGSEYY RCGGSLISPC WVISATHCFI PQPKKEDYIV YLGRSRLNSN TQGEMKFEVE NLILHKDYSADIAA QHNDIA LLKIRSKEGR CAQPSRTIQT ISLPSMYNDP QFGTSCEITG FGKENSTDRLYPE QLKMTVV KLISHRECQQ PHYYGSEVTT KMLCAADPQW KTDSCQGDSG GPLVCSLQGR MTLTGIVSWG RGCALKDKPG VYTRVSHFLP WIRSHTKEEN GLAL (129-381)	GGSSGG (382-387)	-	DKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQ YNSTY RVVSVLTVLHQDWLN GKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDI AVE WESNGQPENNYKTT PPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFS CSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG (388-613)	DGHHHHHHGSLQD SEVNQEAKPEVKPE VKPETHINLKVSDGS SEIFFKIKKTTPLRRL MEAFAKRQGKEMD SLTFLYDGIEIQADQ TPEDLDMEDNDIIEA HREQIGG (21-128)
1037	6xHis-sumo-uPA (SEQ ID NO: 987)	-	II GGEFTTIENQ PWFAAIYQRY EGGSEYYRCG GSLISPCWVISATH CFIPQPKKEDYIVY LGRSRLNSNTQGE MKFEVENLILHKDY SADIAAQHNDIALL KIRSKEGRCAQPS RTIQTICLPSMYND PQFGTSCEITGFGK ENSTDRLYPE QLKMTVVKLI SHRECQQPHY YGSEVTTKML CAADPQWKTDSC QGDSGGPL VCSLQGRMTL TGIVSWGRGC ALKDKPGVYT RVSHFLPWIR SHTKEENGLA L (109-361)	-	-		MGHHHHHHGSLQD SEVNQEAKPEVKPE VKPETHINLKVSDGS SEIFFKIKKTTPLRRL MEAFAKRQGKEMD SLRFLYDGIRIQADQ APEDLDMEDNDIIEA HREQIGG (1-108)

SEQ ID No.	Nombre	Señal de secuencia (residuos números)	Dominio catalítico	Ligador (residuos números)	Secuencia de activación	Compañero de fusión	Otro dominio de N terminal
1038	6xHis sumo-uPA (SEQ ID NO: 21)	-	II GGEFTTIENQ PWFAAIYQRY EGGSEYYRCG GSLISPCWVI SATHCFIPQP KKEDYIVYLG RSRLNSNTQGEMK FEVENLI LHKDYSADIA AQHNDIALLK IRSKEGRCAQ PSRTIQTISL PSMYNDPQFGTSC EITGFGK ENSTDRLYPE QLKMTVVKLI SHRECQQPHY YGSEVTTKML CAADPQWKTDSC QGDSGGPL VCSLQGRMTL TGIVSWGRGC ALKDKPGVYT RVSHFLPWIR SHTKEENGLAL (109-361)		-		MGHHHHHHGSLQD SEVNQEAKPEVKPE VKPETHINLKVSDGS SEIFFKIKKTTPLRRL MEAFAKRQGKEMD SLRFLYDGIRIQADQ APEDLDMEDNDIIEA HREQIGG (1-108)
1039	6xHis sum- uPA (SEQ ID NO: 21)-GGSCK	-	II GGEFTTIENQ PWFAAIYQRYEGG SEYYRCGGSLISPC WVISATHCFIPQPK KEDYIVYLGRSRLN SNTQGEMKFEVEN LILHKDYSADIAAQ HNDIALLKIRSKEG RCAQ PSRTIQTISLPSMY NDPQFGTSCEITGF GKENSTDRLYPEQ LKMTVVKLISHREC QQPHYYGSEVTTK MLCAADPQWKTDS CQGDSGGPLVCSL QGRMTLTGIVSWG RGCALKDKPGVYT RVSHFLPWIRSHTK EENGLAL (109-361)		-	GGSCK (362-366)	MGHHHHHHGSLQD SEVNQEAKPEVKPE VKPETHINLKVSDGS SEIFFKIKKTTPLRRL MEAFAKRQGKEMD SLRFLYDGIRIQADQ APEDLDMEDNDIIEA HREQIGG (1-108)

La Figura 3 presenta esquemas de los polipéptidos de u-PA con fusiones en el extremo C, tal como los polipéptidos de fusión en el extremo C expuestos en SEQ ID NOS: 1006-1018 y 1036.

I. Ensayos para evaluar cantidades de u-PA y actividad de ruta de complemento

Las fusiones de polipéptido de u-PA se produjeron después de la transfección del vector pcDNA3_4 que codifica para la fusión de polipéptido de u-PA nativo y alterado en un sistema de expresión de mamífero en células Expi293™. Los polipéptidos de u-PA que se expresaron correctamente en células Expi293™ se purificaron en una matriz de afinidad de albúmina humana HP o CaptureSelect™ de proteína HiTrap y se procesaron para ensayos bioanalíticos tal como un ELISA de u-PA para examinar los títulos uPA o un ensayo de escisión proteolítica de FRET C3 para examinar la actividad catalítica del polipéptido de u-PA. Los resultados se exponen en la tabla posterior:

SEQ ID NO:	A280	Cantidad total de proteína de cultivo de 1L'	título de uPA ELISA (mg/L)	título de uPA ELISA (mg/L)	Actividad proteolítica en C3 con respecto a A280	Actividad proteolítica en C3 con respecto al título de uPA ELISA
1004			0.4	0.4		
1005			149.7	75.39		
1006			2.6	2.2		
1007			0.3	0.3		
1008			0.1	0.06		
1009			0.3	0.26		
1010	4.23 mg/ml	36.4 mg	17.3	15.89	110.36	773.05
1011	1.69 mg/ml	23.0 mg	19.3	21.66	0.06	0.1
1012			16.2	7.5		
1013			4.7	5.46		
1036	3.32 mg/ml	42.5 mg				
1014						
1015u	3.43 mg/ml	70.3 mg				
1015a	1.16 mg/ml	44.7 mg				
1015i						
1016						
1017	3.32 mg/ml	89.3 mg				
1018	1.10 mg/ml	11 mg				

1. niveles de ELISA de u-PA

Se utiliza un ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas (ELISA) para medir la presencia de polipéptidos de u-PA (ver, *por ejemplo,* Ejemplo 15). Habitualmente, la medición de u-PA es una medida indirecta de la unión de u-PA a un anticuerpo de captura (PA1-36166 a 1.0ug/mL, Invitrogen). El polipéptido de u-PA capturado se detecta entonces con un anticuerpo de detección (PA1-36015 a 0.25 ug/mL) que se reconoce mediante el anticuerpo anticabra conjugado con HRP (Rockland, 605-403-B69). La enzima HRP desencadena una reacción colorimétrica entonces de la adición del sustrato TMB. Usando el método ELISA de u-PA, se identificaron cuatro polipéptidos de u-PA para expresarse a altos niveles de titulación de uPA (SEQ ID NO: 1005, 1010, 1011, 1012, 1015), dos polipéptidos de u-PA a títulos medianos (SEQ ID NO: 1006 y 1013), y polipéptidos de u-PA expuestos en SEQ ID NOS: 1004, 1007-1009 no se expresaron.

2. **Actividad de enzima (péptido de FRET de C3 humana).**

La actividad proteolítica de polipéptidos de uPA en C3 humana se midió in vitro usando un péptido de FRET de C3 humana RHQARASHL EDANS/DABCYL producido por Genscript (lote #94045990005/ PE6379) (ver, *por ejemplo,* Ejemplo 15). El lado N-terminal del péptido se etiqueta con un fluoróforo DABCYL y el lado C-terminal se etiqueta con un fluoróforo EDANS. La escisión del péptido separa el par de FRET EDANS/DABCYL para generar una señal fluorescente, que se mide en un lector de placas de múltiples pocillos. La tasa de generación de intensidad de fluorescencia se interpola contra una curva estándar EDANS para producir la tasa de generación del producto EDANS. La velocidad de generación del producto se multiplica por el factor de dilución para proporcionar una actividad específica volumétrica en unidades de producto nmol por minuto de reacción por mL de muestra (nmol/min/mL). La actividad específica volumétrica indica la cantidad total de enzima activa en la muestra. La segunda actividad específica se calcula dividiendo la actividad específica volumétrica por la concentración de enzima de muestra para proporcionar una actividad específica de enzima en unidades de producto nmol por minuto de reacción por mg de enzima (nmol/min/mg). La actividad específica de enzima indica la actividad intrínseca de polipéptidos uPA en la muestra independientemente de la concentración. Usando el ensayo de actividad de FRET de C3 humana, polipéptido uPA expuesto en SEQ ID NO: Se demostró que 1010 es activo.

* * *

Dado que las modificaciones serán evidentes para aquellos expertos en esta técnica, se pretende que esta invención se limite únicamente por el alcance de las reivindicaciones anexas.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2021/0008338
Recibo: 24-49061
Fecha: 24/06/2024

CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO
CC: 66.783.790
Pago PSE No: 982177
CUS: 726325267

Patente PCT
POLIPÉPTIDOS DE ACTIVADOR DE PLASMINÓGENO, TIPO UROCINASA, MODIFICADOS Y MÉTODOS DE USO

Detalle del pago

Id.	Rentístico	Concepto y Servicio	Cant.	Val. Unit.	Subtotal
1	50005-01-03	Modificaciones / Correcciones al registro Patente PCT (DESCUENTO INTERNET)	1	$ 214,000	$ 214,000
		TOTAL			$ 214,000

Sede Centro: Carrera 13 No.27-00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá D.C. - Colombia
Web: www.sic.gov.co e-mail:contactenos@sic.gov.co Conmutador:(571)5870000 Contact Center: (571)5920400