

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. **22577** notificado electrónicamente el 24 de diciembre de 2024, relacionado con los requerimientos de fondo de la solicitud, y para el cual oportunamente solicité prórroga el 20 de marzo de 2025, atentamente me permito presentar la siguiente información:

1. Título

El examinador ha señalado que el título de la invención, "POLIPÉPTIDOS DE ACTIVADOR DE PLASMINÓGENO, TIPO UROCINASA, MODIFICADOS Y MÉTODOS DE USO", no guarda una relación precisa con el objeto de la solicitud tal como se define en las reivindicaciones.

Asimismo, considera que el título propuesto en respuesta al anterior requerimiento no subsana adecuadamente la observación, dado que hace referencia a "polipéptidos" en plural y no especifica la modificación que presentan dichos polipéptidos: "POLIPÉPTIDOS ACTIVADORES DEL PLASMINÓGENO DE TIPO UROQUINASA MODIFICADOS Y COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN LOS POLIPÉPTIDOS MODIFICADOS".

Con el fin de superar esta objeción, el solicitante ha modificado el título para que refleje con mayor precisión el objeto de la invención, proponiendo el siguiente texto:

"POLIPÉPTIDOS MODIFICADOS DEL POLIPÉPTIDO ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO DE TIPO UROQUINASA (u-PA) QUE COMPRENDEN LA MODIFICACIÓN V41R, COMPOSICIONES QUE CONTIENEN DICHOS POLIPÉPTIDOS MODIFICADOS Y MÉTODOS PARA SU PREPARACIÓN".

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, presento junto a este memorial un nuevo capítulo reivindicatorio que consta de noventa y cinco (95) reivindicaciones, el cual reemplaza completamente el documento presentado el 24 de junio de 2024. Específicamente, se realizaron las siguientes modificaciones:

- 2.1 Se modificó la reivindicación 1 con el fin de:
 - 2.1.1 Modificar la redacción del preámbulo para aclarar que la estructura del péptido comprende modificaciones realizadas en un polipéptido u-Pa no modificado.
 - 2.1.2 Eliminar la expresión donde se mencionaba que las modificaciones podrían seleccionarse de reemplazos, inserciones y deleciones.
 - 2.1.3 Eliminar la expresión donde se mencionaba que el polipéptido podía inhibir o reducir la activación del complemento.
 - 2.1.4 Aclarar que el polipéptido u-PA no modificado consiste de una porción del polipéptido de SEQ ID NO: 1, 3, 4 y 6.
 - 2.1.5 Se restringió el grupo de modificaciones a partir de las cuales se puede modificar el polipéptido.
- 2.2 Se eliminaron las reivindicaciones 4, 6, 7, 21, 22, 27 y 90. Además se ajustó la numeración del documento.
- 2.3 Se modificó la antigua reivindicación 5 (nueva reivindicación 4) con el fin de restringir el grupo del que se seleccionan las modificaciones al polipéptido.
- 2.4 Se modificó la antigua reivindicación 8 (nueva reivindicación 5) con el fin de eliminar la expresión “*en el polipéptido u-PA modificado*”.
- 2.5 Se modificó la antigua reivindicación 13 (nueva reivindicación 10) con el fin de restringir el grupo del que se seleccionan las modificaciones al polipéptido.

- 2.6 Se modificó la antigua reivindicación 15 (nueva reivindicación 12) con el fin de restringir el grupo de secuencias que caracterizan el polipéptido de u-PA modificado.
- 2.7 Se modificó las antiguas reivindicaciones 23 a 26 (nuevas reivindicaciones 18 a 21) con el fin de aclarar que el proceso de incubación es *in vitro*. Dicha modificación se sustenta en las páginas 15, 26, 42, 126 y 130 de la descripción.
- 2.8 Se modificó las antiguas reivindicaciones 35, 37 y 43 (nuevas reivindicaciones 29, 31, y 37 con el fin de eliminar la referencia a porcentajes de identidad.
- 2.9 Se modificaron la antigua reivindicación 84 y 86 (nueva reivindicación 80), con el fin de aclarar que la célula aislada no es una célula vegetal ni un cigoto humano. Dicha modificación se sustenta en las páginas 14 y 149 de la descripción.
- 2.10 Se modificó la antigua reivindicación 85 (nueva reivindicación 79), con el fin de aclarar que la célula aislada en donde la línea celular, que no es no es una línea celular vegetal, es de origen mamífero, insecto, levadura o procariota. Dicha modificación se sustenta en las páginas 146 a 149 de la descripción.
- 2.11 Se modificó la antigua reivindicación 87 (nueva reivindicación 81), de la cual dependen las demás, para indicar expresamente que se trata de una combinación que comprende dos composiciones. Dicha modificación se sustenta en las páginas 68 y 69 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. 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.

Por otra parte, es deseo del solicitante requerir que, si el examinador considera que aún existen motivos que impidan la concesión de la solicitud, proceda a emitir un nuevo examen de patentabilidad, para lo cual se anexa el respectivo pago de nuevo examen.

4. Excepción de Patentabilidad

Objeciones del examinador:

El examinador ha señalado objeciones de patentabilidad con base en los literales a) y d) del artículo 20 de la Decisión 486 de 2000 de la Comunidad Andina. En particular, indica que:

- Las reivindicaciones 84 y 86 no serían patentables al referirse a una célula que contiene un ácido nucleico sin mayor especificidad, lo cual podría interpretarse como una alusión a células embrionarias humanas, vulnerando disposiciones sobre orden público y moral.
- Las reivindicaciones 23 a 26 también han sido objetadas por involucrar aspectos relacionados con métodos terapéuticos, específicamente por referirse a la estabilidad de un polipéptido en fluidos corporales, lo cual se vincula con un tratamiento médico.
- Finalmente, las reivindicaciones 87 a 95 han sido cuestionadas por referirse a una combinación terapéutica de un polipéptido u-PA con otro agente para tratar enfermedades mediadas por el complemento, lo que constituye un método de tratamiento excluido de patentabilidad.

Argumentos del solicitante:

En este sentido, sin estar de acuerdo con la objeción, pero con el fin de dar continuidad al proceso, las reivindicaciones 84 y 86 han sido modificadas para establecer

expresamente la limitación de que la célula aislada no es un cigoto humano, lo cual hace que la objeción pueda darse por superado. En ese sentido se desea aclarar que las células aisladas y los cultivos celulares que contienen las moléculas de ácido nucleico o los vectores pueden corresponder a células no humanas o a cultivos celulares no humanos, pero no incluyen cigotos ni células que se desarrollen en un ser humano, tal como se indica explícitamente en la página 14, líneas 13 a 20 de la memoria descriptiva.

Adicionalmente, el solicitante desea aclarar que en la página 170 se aclara que se hace referencia a una célula recombinante aislada derivada de una célula madre, y en la página 177 se menciona específicamente el uso de células madre mesenquimales (MSC), que no son células embrionarias. Estas células tienen la capacidad de diferenciarse hacia tejidos específicos y, por tanto, no comprometen la integridad de un embrión ni plantean preocupaciones éticas, como sugiere el examinador. La descripción lo establece de manera clara:

"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."

Cabe recordar que la protección por patente se determina por el lenguaje de las reivindicaciones, y la descripción solo cumple una función interpretativa. Ningún otro documento debe emplearse para ampliar o alterar el alcance pretendido de la protección. Este argumento está directamente respaldado por la Decisión 486, Artículo 51, que establece:

"El alcance de la protección conferida por la patente estará determinado por el contenido de las reivindicaciones. La descripción, los dibujos y, en su caso, la lista de secuencias o el depósito del material biológico servirán para interpretar las reivindicaciones." (Art. 51, Decisión 486)

Por otra parte, el solicitante respetuosamente manifiesta su desacuerdo con la objeción planteada respecto de las antiguas reivindicaciones 23 a 26. Estas están dirigidas a polipéptidos modificados u-PA, no a métodos ni a tratamientos. Si bien los polipéptidos u-PA modificados pueden utilizarse eventualmente en tratamientos de enfermedades relacionadas con la proteína del complemento C3, las antiguas reivindicaciones 23 a 26 (nuevas reivindicaciones 18 a 21) describen los polipéptidos y sus propiedades

observadas en ensayos *in vitro*. No obstante, para atender la objeción y facilitar el avance del examen, dichas reivindicaciones han sido modificadas para especificar que la incubación se realiza *in vitro*, lo que hace que la objeción pierda fundamento. Dicha modalidad se contempla en la descripción, que sugiere que la evaluación de la actividad del polipéptido se puede realizar *in vitro*, tal como se establece en las páginas 15, 26, 42, 126 y 130. En ese sentido, dicha restricción permite dirigir el alcance de protección únicamente a procedimientos realizados *in vitro*, y por ende excluye de este cualquier alusión directa o indirecta a métodos de tratamiento, tal como establece la legislación aplicable.

Adicionalmente, en la página 42, se menciona explícitamente que la actividad de los polipéptidos modificados u-PA puede evaluarse *in vitro* mediante ensayos de activación del complemento, utilizando suero humano o componentes purificados. Este pasaje respalda la viabilidad de realizar los procesos descritos en la invención fuera de un contexto terapéutico o *in vivo*, y refuerza la claridad de que el alcance de protección se limita a la realización de dichos procesos en condiciones *in vitro*, que según la Real academia de la lengua lo define como:

*"in vitro: Realizado en el laboratorio, en un medio creado artificialmente fuera del organismo vivo."*¹

En ese sentido, enfatizamos que la descripción permite interpretar y abarcar todo el desarrollo de la invención; sin embargo, amablemente solicitamos que se evalúe puntualmente el alcance de protección conferido en las reivindicaciones, que es por definición como lo establece el artículo 26 de la Decisión 486:

"Las reivindicaciones son cláusulas que delimitan el objeto para el que se solicita la protección."

La reivindicación se refiere específicamente a la estabilidad del polipéptido modificado durante un proceso de incubación realizado explícitamente *in vitro*. Independientemente de si el fluido utilizado es PBS o un fluido corporal como el humor acuoso, el procedimiento no constituye un método terapéutico, ya que el fluido puede ser extraído para fines de prueba. Por tanto, la interpretación debe mantenerse dentro

¹ *in vitro* | Diccionario del estudiante | RAE." Accessed: May 06, 2025. [Online]. Available: <https://www.rae.es/diccionario-estudiante/in%20vitro>

de los límites establecidos por el lenguaje de la reivindicación, sin verse influida por conocimientos externos del estado de la técnica ni extrapolaciones desde la descripción.

Por último, el solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la objeción respecto de las reivindicaciones 87 a 95. Estas se refieren a combinaciones farmacológicas que comprenden un polipéptido u-PA modificado y un segundo agente con la característica técnica de inhibir o reducir la activación del complemento (reivindicación 87). Las reivindicaciones 88 a 95 especifican el tipo de agente y/o el subconjunto del polipéptido u-PA con las modificaciones descritas. Todas estas reivindicaciones están dirigidas a composiciones, no a métodos de tratamiento en humanos o animales.

Sin embargo, con el fin de dar claridad, se ha modificado la antigua reivindicación 87 (nueva reivindicación 81), de la cual dependen las demás, para indicar expresamente que se trata de una combinación que comprende dos composiciones. La base para esta redacción se encuentra, por ejemplo, en las páginas 68 y 69 de la memoria descriptiva:

"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."

En consecuencia, amablemente se solicita al examinador dar por superada la objeción basada en la excepción de patentabilidad.

5. 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:

- 5.1.** El examinador objeta la reivindicación 1 por carecer de claridad ya que la frase "*las modificaciones de aminoácidos se seleccionan entre reemplazos, inserciones y delecciones*" no está sustentada en la descripción, ya que solo se describen sustituciones. Por ende, el examinador señala que esta redacción genera una amplitud injustificada al abarcar polipéptidos no explorados.

Así mismo, el examinador objeta la reivindicación 1 debido a que observa que la expresión "*al menos 17 modificaciones*" es ambigua, ya que no se aclara cuántas ni cuáles son dichas modificaciones. Por ende, el examinador concluye que dicha expresión impide identificar con precisión los polipéptidos protegidos y amplía injustificadamente el alcance de la invención.

El solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del examinador. Los métodos para modificar un polipéptido, como inserciones, delecciones y sustituciones, son procedimientos rutinarios para una persona experta en la técnica. La solicitud proporciona datos suficientes, incluyendo resultados de actividad de escisión para cerca de 1000 variantes de polipéptidos, que permiten a una persona versada en fabricar polipéptidos dentro del alcance de la reivindicación 1, incluso aquellos que incluyen inserciones, delecciones o sustituciones, y que comprenden al menos 17 modificaciones.

No obstante, con el fin de facilitar el avance del examen, la reivindicación 1 ha sido modificada para suprimir la referencia explícita al tipo y número de modificaciones. En su lugar, se hace referencia a un polipéptido modificado que incluye modificaciones seleccionables del grupo definido en la propia reivindicación. En ese sentido, se solicita amablemente considerar superada la presente objeción.

- 5.2** Adicionalmente, el examinador considera que la redacción de la reivindicación 1 carece de claridad, al utilizar la expresión "*el polipéptido de u-PA modificado escinde la proteína de complemento C3 para inhibir o reducir de este modo la activación del complemento*". Según el examinador, esta redacción hace referencia a un resultado a alcanzar, en lugar de definir el polipéptido a través de sus características técnicas esenciales. En consecuencia, sugiere reemplazar dicha formulación por una caracterización estructural que delimite de manera

precisa el alcance del polipéptido, basada en las variantes estructurales evaluadas en la invención.

Como se expuso anteriormente, la reivindicación 1 ha sido modificada para definir polipéptidos que comprenden cadenas específicas de sustituciones de aminoácidos, numeradas según la quimotripsina, introducidas en el dominio de proteasa de u-PA no modificado, así como en polipéptidos más largos que comprenden dicha porción catalíticamente activa. El polipéptido u-PA no modificado en el que se introducen estas sustituciones corresponde a cualquiera de las secuencias de aminoácidos establecidas en los SEQ ID NO: 1 a 6, o a una porción catalíticamente activa de los polipéptidos de SEQ ID NO: 1, 3, 4 y 6, que comprende el dominio de proteasa correspondiente a SEQ ID NO: 2 o 5. Todas las mutaciones reivindicadas se localizan en dicho dominio de proteasa, según se establece en los SEQ ID NO: 2 y 5.

Los polipéptidos que comprenden cada una de las combinaciones de sustituciones de aminoácidos descritas se presentan en la solicitud con evidencia experimental que demuestra su capacidad para reconocer y escindir la proteína C3 del complemento. La especificidad y la actividad de escisión de los polipéptidos u-PA modificados se respaldan ampliamente en la memoria descriptiva mediante datos experimentales; no se trata de meros resultados deseados. La escisión de C3 por parte de estos polipéptidos resulta en una inhibición o reducción de la activación del sistema del complemento. A modo ilustrativo, el Ejemplo 2, tal como se presenta en la solicitud originalmente presentada, describe en detalle la actividad de escisión de C3 por los polipéptidos modificados. Asimismo, en la Tabla 14 (a partir de la página 218 de la memoria), se cuantifica la ED50 correspondiente a dicha escisión, en función de las modificaciones introducidas en u-PA.

Dado que la reivindicación 1 define de manera completa y precisa las secuencias de aminoácidos de cada polipéptido incluido dentro de su alcance, el solicitante sostiene que los polipéptidos reivindicados están suficientemente caracterizados por sus características técnicas esenciales, que están directamente relacionadas con su funcionalidad. No obstante, con el único propósito de facilitar el avance del examen, el solicitante ha accedido amablemente a modificar la redacción de la reivindicación 1 para eliminar la referencia funcional señalada por el examinador, concretamente: "el polipéptido u-PA modificado escinde la proteína C3 para inhibir o reducir la activación del complemento". Con esta modificación, se considera que la objeción planteada ha sido superada.

5.3 El examinador señala que la reivindicación 1 carece de claridad y sustento debido a que no se proporciona la SEQ ID NO correspondiente al polipéptido modificado, lo cual impide una clara caracterización de la invención. También indica que las SEQ ID NO: 1, 3, 4 y 6 que allí se proporcionan no corresponden al polipéptido modificado.

El examinador también objeta la reivindicación 1 por carecer de claridad debido a que se mencionen variantes como C122C, cuando en la descripción todos los polipéptidos comprenden el residuo C122S. Indica que ello introduce materia no divulgada. El examinador así mismo objeta la reivindicación 1 por carecer de claridad y sustento ya que considera que la referencia a porciones catalíticamente activas no está sustentada, ya que en la solicitud únicamente se divulgan polipéptidos completos.

Así mismo, el examinador destaca que la reivindicación 1 carece de claridad debido a que presenta una contradicción dentro de la redacción de la reivindicación. Esto debido a que algunas secuencias incluyen la modificación V41Q en lugar de V41R, lo cual contradice el criterio de que todos los polipéptidos deben contener V41R.

El solicitante discrepa respetuosamente de la opinión del examinador. Como se ha señalado previamente, la reivindicación 1 define que el polipéptido u-PA no modificado consiste en la secuencia establecida en cualquiera de los SEQ ID NO: 1 a 6, o en una porción catalíticamente activa del polipéptido de los SEQ ID NO: 1, 3, 4 y 6 que contiene el dominio de proteasa correspondiente a SEQ ID NO: 2 o 5. Esta reivindicación establece de manera clara las variantes de u-PA que se encuentran dentro del alcance de protección, en las cuales cada una de las modificaciones mencionadas se localiza en el dominio de proteasa, y en las que pueden estar presentes residuos adicionales hasta completar la longitud total de u-PA según se establece en los SEQ ID NO: 1, 3, 4 y 6.

Cada uno de los polipéptidos reivindicados conserva actividad catalítica en virtud de la presencia del dominio de proteasa, incluso en ausencia del resto de la secuencia completa de u-PA. En consecuencia, cualquier polipéptido que contenga los dominios de proteasa modificados, tal como se reivindican, será funcionalmente activo. Todas las sustituciones de aminoácidos se introducen específicamente dentro del dominio de proteasa, y los polipéptidos resultantes están diseñados para unirse específicamente a la proteína C3 del complemento y escindir la en su sitio de escisión característico (QHAR↓ASHL). Se requiere que los polipéptidos posean la propiedad técnica de una

unión y escisión mejoradas de C3, propiedad que no se observa en el u-PA de tipo salvaje, el cual no reconoce eficientemente dicho sitio objetivo y presenta una actividad significativamente inferior —varios órdenes de magnitud por debajo— en comparación con los polipéptidos modificados.

La reivindicación recita expresamente todas las modificaciones en referencia a las secuencias no modificadas, lo que proporciona claridad estructural suficiente. Por tanto, una persona experta en la materia comprenderá la estructura del u-PA, así como sus diversas formas funcionales, y reconocerá a partir de los datos incluidos en la solicitud que no se requiere la proteína completa ni la forma de dos cadenas para conferir actividad catalítica. Véase, por ejemplo, la explicación contenida en la página 34 de la memoria, que se reproduce a continuación:

"La cita de "u-PA" comprende la forma activada o de dos cadenas el 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 postraducciona. Estas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, glicosilación, pegilación, albuminación, farnisilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación y otras modificaciones de polipéptidos conocidas en la técnica."

Véase, por ejemplo, la página 77:

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 35 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).

La aplicación que describe y define el dominio de la proteasa y la porción catalíticamente activa. El dominio proteasa es una porción catalíticamente activa de la proteasa u-PA; la referencia al dominio proteasa incluye las formas de cadena simple, dos y múltiples de cualquier u-PA, véase, por ejemplo, la página 31 y 32, reproducida a continuación:

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 30 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 35 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.

Véase, por ejemplo, la página 35:

"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 25 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

30 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 35 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."

Adicionalmente el solicitante desea aclarar que la solicitud y las reivindicaciones enumeran de manera detallada las modificaciones de aminoácidos introducidas en el dominio de proteasa del u-PA no modificado, conforme a la numeración de quimotripsina, para generar dominios de proteasa u-PA modificados y polipéptidos que los contienen. Por ende, una persona versada en el campo de las serinas proteasas comprendería que los polipéptidos u-PA pueden presentarse en distintas longitudes, y, a la luz de la información contenida en la solicitud, entendería que cualquiera de los dominios de proteasa modificados reivindicados puede incorporarse para generar polipéptidos u-PA modificados catalíticamente activos, incluso hasta alcanzar la longitud completa del u-PA.

Los datos experimentales incluidos en la solicitud demuestran que cada uno de los dominios de proteasa modificados, que contienen las cadenas de mutaciones específicas reivindicadas, son catalíticamente activos incluso como cadenas simples. Por extensión, los polipéptidos de mayor longitud que incluyen dichos dominios de proteasa también conservarán actividad. En las páginas 208 a 242 de la memoria, se enumeran de forma precisa las modificaciones de aminoácidos en el dominio de proteasa de cadena simple del u-PA no modificado, junto con los correspondientes SEQ ID NO. Estas secuencias ejemplifican dominios de proteasa modificados que incorporan mutaciones reivindicadas, como el reemplazo C122S, que se introduce para reducir o evitar la agregación no deseada.

La reivindicación 15 (modificada como reivindicación 12) especifica los SEQ ID NO de los dominios de proteasa modificados, correspondientes a las combinaciones de mutaciones establecidas en la reivindicación 1. Una persona versada en la materia reconocería que estos dominios son representativos y que tanto los polipéptidos de

longitud completa como las formas precursoras pueden incorporar las sustituciones citadas, conservando actividad catalítica, ya sea en forma completa o en fragmentos funcionales del dominio de proteasa.

Respecto al rechazo basado en la falta de concordancia con la sustitución V41R, la reivindicación 1 ha sido enmendada para eliminar la recitación "V41R y al menos 17 modificaciones" y para excluir expresamente cualquier polipéptido que no sea coherente con dicha modificación, con el fin de mantener la consistencia con la elección del Grupo 1 y dejar sin efecto el rechazo por unidad de invención, expuesto más adelante en este memorial.

No obstante, el solicitante manifiesta su desacuerdo con la apreciación del examinador en relación con las SEQ ID NO: 1, 3, 4 y 6. La reivindicación 1 define claramente los polipéptidos no modificados y recita las mutaciones introducidas en ellos. Como se explicó anteriormente, cada polipéptido reivindicado contiene un dominio de proteasa modificado y puede incluir residuos contiguos adicionales de las secuencias no modificadas establecidas en los SEQ ID NO: 1, 3, 4 y 6. Reescribir las reivindicaciones para incluir de forma individualizada todos los posibles SEQ ID NO de cada variante excedería ampliamente la capacidad de la solicitud, ya que implicaría enumerar miles de combinaciones. Dado que el dominio de proteasa constituye el elemento catalíticamente funcional, la descripción mediante la introducción de mutaciones sobre secuencias no modificadas es suficiente para definir de manera completa el alcance de los polipéptidos reivindicados, sin necesidad de listar cada una de las secuencias completas.

En su forma modificada, la reivindicación 12 especifica los SEQ ID NO de los dominios de proteasa modificados u-PA que corresponden a las combinaciones de mutaciones descritas en la reivindicación 1, lo cual refuerza la claridad y completitud de la reivindicación.

Adicionalmente, el solicitante no está de acuerdo con que las reivindicaciones deban limitarse únicamente a polipéptidos que contengan la sustitución C122S. Tal limitación sería indebida, dado que: (1) C122 (o C122C) representa el residuo nativo, y (2) la intercambiabilidad entre C122 y C122S ha sido reconocida como práctica rutinaria en el campo desde hace más de 20 años, siendo objeto incluso de patentes previas. La posición C122, de acuerdo con la numeración de quimotripsina, corresponde a una cisteína natural del u-PA no modificado, la cual participa en la formación de un puente disulfuro con Cys148 (C97a) para originar la forma de dos cadenas del u-PA de tipo salvaje.

Véase, por ejemplo, la página 79, líneas 20-27 de la memoria, que recita:

" (...) 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)."

C122 (también referido como C122C) es el residuo de aminoácido nativo en la posición correspondiente, según la numeración de quimotripsina, en MTSP-1. Este residuo corresponde a una cisteína libre, bien conocida por su capacidad para formar enlaces disulfuro no deseados que puedan inducir agregación proteica, especialmente en condiciones *in vitro*. Por esta razón, es habitual sustituirla mediante un reemplazo conservador por serina (C122S), con el fin de reducir o evitar dicha agregación durante la experimentación. Esta sustitución es completamente opcional y no altera la actividad enzimática del dominio de proteasa.

La solicitud enseña de manera explícita que los polipéptidos u-PA modificados pueden incluir o no la sustitución C122S. Dicha modificación se introduce principalmente para mejorar la estabilidad de las proteínas en experimentos *in vitro*, dado que la cisteína en la posición 122 puede formar enlaces disulfuro con otras cisteínas libres presentes en diferentes moléculas, lo que favorece la agregación. La serina, al carecer de un grupo tiol, no participa en la formación de enlaces disulfuro, lo que previene dicha agregación sin comprometer la función del dominio de proteasa, incluida su capacidad de escindir la proteína C3 del complemento.

Tal como se describe a lo largo de la solicitud, el reemplazo C122S no afecta negativamente la actividad catalítica de los polipéptidos u-PA modificados. Por el contrario, su inclusión busca optimizar el comportamiento de la proteína en condiciones experimentales controladas, especialmente cuando se trabaja con la forma de cadena simple del u-PA. Aunque resulta beneficioso para estudios *in vitro*, este reemplazo no es necesario para mantener la actividad funcional del polipéptido.

Véase, por ejemplo, la página 5, líneas 10-19 de la descripción, que establece:

"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."

Véase también, por ejemplo, el párrafo que comienza en la página 206:

"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." (Énfasis añadido)

La descripción de los polipéptidos u-PA modificados que no incluyen el reemplazo C122S también se puede encontrar en las páginas 207 y 208 (énfasis añadido):

"Los polipéptidos incluyen el reemplazo C122S para evitar la agregación tras la expresión, por ejemplo, del dominio proteasa. En algunas modalidades, el polipéptido 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)

La descripción de los polipéptidos u-PA modificados que no incluyen el reemplazo C122S también se puede encontrar en la página 154, que detallan modificaciones ejemplares del polipéptido u-PA, y se dice (énfasis añadido):

"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" (Énfasis añadido)

C122S no afecta la actividad de los polipéptidos. Es bien sabido en la técnica que el residuo C122 es una cisteína libre en el dominio de la proteasa serina proteasas, incluyendo, por ejemplo, u-PA y MTSP-1, y que el residuo C122 puede ser reemplazado por S para eliminar la agregación. Se clonó y describió el dominio proteasa de la familia de polipéptidos MTSP en una familia de aplicaciones y patentes, y en todos los dominios proteasa con C122S también se prepararon. Por ejemplo, véase el párrafo (24) de la patente de EE.UU. n.º 7.700.341, que es miembro de una familia de patentes y aplicaciones, con prioridad hasta el año 2000 y anteriores, titulada *"Moléculas de ácido nucleico que codifican proteasas de serina transmembrana, las proteínas codificadas y métodos basados en ellas"*, a Madison et al., que dice:

(24) También se proporcionan muteínas de los dominios de proteasa de cadena simple y MTSP, en particular muteínas en las que el residuo de Cys en el dominio de la proteasa que está libre (es decir, no forma enlaces disulfuro con ningún otro residuo de Cys en la proteína) se sustituye por otra sustitución de aminoácidos, preferiblemente con una sustitución de aminoácidos conservadora o una subestación [sic] que no elimina la actividad, y muteínas en las que se elimina uno o varios sitios de glicosilación. También se contemplan muteínas en las que se contemplan otras sustituciones conservadoras de aminoácidos en las que se conserva la actividad catalítica (véase, por ejemplo, la Tabla 1 para ejemplos de

sustituciones de aminoácidos). Véase, también, la FIG. 4, que identifica los residuos libres de Cys en MTSP3, MTSP4 y MTSP6.

Esta familia de aplicaciones y patentes muestra y reivindica los dominios de proteasa de las serinas proteasas, por ejemplo, MTSP-1 y u-PA, y muestra que el dominio de proteasa con y sin el C122S, siguen siendo proteínas catalíticamente activas como cadenas simples. Esta familia describe el reemplazo de C122 por S para eliminar la cisteína libre. Por lo tanto, las serinas proteasas con y sin la modificación en C122 eran bien conocidas en la técnica durante más de 15 años antes de la fecha de prioridad más antigua.

La solicitud describe de manera clara y consistente que el polipéptido u-PA modificado puede incluir el reemplazo C122S o mantener el residuo nativo C122 (también referido como C122C), siendo dicha sustitución opcional. El reemplazo C122S se incorpora específicamente para reducir o prevenir la agregación, en particular en condiciones in vitro, y no afecta la actividad catalítica ni la especificidad del sustrato. Esto se indica a lo largo de toda la solicitud, incluyendo en el texto que acompaña a las tablas de resultados experimentales.

Además, la solicitud especifica que la sustitución C122S fue incluida en los polipéptidos de cadena simple utilizados en ensayos in vitro para minimizar la agregación proteica, sin que ello tenga impacto sobre la funcionalidad de escisión de C3 por parte de los polipéptidos u-PA modificados.

Una persona experta en el campo comprendería inequívocamente que la modificación C122S es opcional, y que es posible obtener polipéptidos u-PA modificados con el residuo nativo C122, siendo S una sustitución conservadora bien conocida para C. Cabe señalar que esta modificación era de conocimiento común en el estado de la técnica mucho antes de la fecha de prioridad más antigua reivindicada por la presente solicitud. Por tanto, no se requiere experimentación adicional para implementar cualquiera de las dos variantes, ya que ambas están habilitadas por las enseñanzas contenidas en la solicitud.

En vista de lo anterior, respetuosamente se solicita considerar superada la presente objeción.

5.4 El examinador objeta las reivindicaciones 2 y 3 por carecer de claridad debido a que no caracterizan adecuadamente al polipéptido, ya que mencionan secuencias sin identificar claramente su estructura con una SEQ ID NO.

En este sentido, el solicitante desea aclarar que la reivindicación 1, de la cual dependen las reivindicaciones 2 y 3, define explícitamente las secuencias de los polipéptidos u-PA

no modificados y recita de forma detallada las modificaciones introducidas en dichas secuencias. La descripción de la solicitud, así como la lista de secuencias, proporciona una caracterización completa de cada una de las formas no modificadas o de tipo salvaje, a saber:

- SEQ ID NO: 1 corresponde al propéptido u-PA de tipo salvaje no modificado;
- SEQ ID NO: 2 corresponde al dominio de proteasa u-PA de tipo salvaje no modificado;
- SEQ ID NO: 3 corresponde al u-PA maduro de tipo salvaje de longitud completa;
- SEQ ID NO: 4 corresponde al propéptido u-PA de tipo salvaje no modificado que incluye la sustitución C122S;
- SEQ ID NO: 5 corresponde al dominio de proteasa u-PA de tipo salvaje no modificado con C122S;
- SEQ ID NO: 6 corresponde al u-PA maduro de tipo salvaje de longitud completa con C122S.

Estas secuencias se presentan como referencia para identificar de manera precisa las secuencias no modificadas en las que se introducen las modificaciones específicas descritas en la reivindicación 1, permitiendo así una descripción completa y clara de los polipéptidos u-PA modificados reivindicados.

Con respecto a la objeción planteada sobre la falta de claridad de las reivindicaciones 2 y 3, el solicitante considera que esta no es procedente. Las reivindicaciones mencionadas sí caracterizan adecuadamente los polipéptidos u-PA modificados a los que se refieren. En particular:

- La Reivindicación 2 se refiere a un polipéptido u-PA modificado según la reivindicación 1, en el cual el polipéptido u-PA no modificado consiste en una de las secuencias establecidas en SEQ ID NOs: 1 a 6.
- La Reivindicación 3 se refiere específicamente a los dominios de proteasa modificados, en los que el polipéptido u-PA no modificado consiste en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5.

La estructura de los polipéptidos u-PA modificados está claramente definida mediante la referencia a las secuencias de partida (SEQ ID NOs) y las modificaciones descritas en la reivindicación 1, lo cual permite a una persona experta en la materia comprender con precisión el alcance técnico de las reivindicaciones. Por lo tanto, respetuosamente se solicita considerar superada la presente objeción.

5.5 El examinador objeta la reivindicación 4 por carecer de claridad ya que esta reivindicación no describe características técnicas esenciales del polipéptido, sino

que se limita a indicar un resultado esperado (ED50 menor a 100 nM), lo cual no es aceptable como elemento distintivo ya que abarcaría todas las estructuras que cumplan con dicho resultado a alcanzar.

Dado que la reivindicación 1 define de manera completa y suficiente las secuencias de cada uno de los polipéptidos u-PA modificados dentro de su alcance, la reivindicación 4 introduce limitaciones funcionales adicionales sobre dichos polipéptidos, resultan redundantes. En consecuencia, dichas reivindicaciones han sido canceladas, lo cual deja sin efecto los rechazos formulados con respecto a las mismas.

5.6 El examinador objeta la reivindicación 5 por carecer de claridad y sustento debido a que la inclusión del residuo C122C no encuentra sustento en la descripción, ya que todos los polipéptidos divulgados contienen la modificación C122S. Además, se indica que las secuencias reclamadas carecen del SEQ ID NO correspondiente, por lo que el examinador solicita limitar la materia a lo divulgado y añadir los identificadores adecuados.

Tal como se explicó en relación con la reivindicación 1, lo mismo aplica a la reivindicación 5. La sustitución del residuo natural C122 por serina (C122S) es opcional y no afecta la actividad del dominio proteasa. Esta característica se enseña expresamente en la presente solicitud, en la que se detalla que los polipéptidos u-PA modificados pueden incluir o no dicho reemplazo. La modificación C122S se incorpora para reducir o eliminar la agregación, especialmente en condiciones in vitro, donde el residuo C122C, al ser una cisteína libre, puede formar enlaces disulfuro con otras moléculas. La sustitución por serina evita dicha agregación sin alterar la actividad catalítica, incluida la escisión de la proteína C3. Tal como se describe a lo largo de la solicitud, esta modificación resulta ventajosa en ciertos contextos experimentales, pero es en todo caso opcional. En ese sentido amablemente se solicita considerar superada la presente objeción.

5.7 El examinador señala que estas reivindicaciones 6 y 7 describen únicamente resultados esperados sin aportar características técnicas específicas del polipéptido. Por tanto, se solicita reformularlas con base en elementos técnicos descritos.

Dado que la reivindicación 1 define de manera completa las secuencias de cada polipéptido comprendido en su alcance, las reivindicaciones 6 y 7, que introducen limitaciones funcionales adicionales respecto de los polipéptidos u-PA modificados,

resultan redundantes. Por lo tanto, dichas reivindicaciones se cancelan, lo que hace que los rechazos correspondientes queden sin efecto.

5.8 El examinador objeta la reivindicación 8 por carecer de claridad ya que las combinaciones de modificaciones mencionadas no están acompañadas de un SEQ ID NO que permita identificar inequívocamente al polipéptido. Se solicita incluir dicho identificador de acuerdo con lo divulgado.

En este sentido, el solicitante manifiesta su desacuerdo con la opinión del examinador, ya que la antigua reivindicación 8 (actual reivindicación 5) define adecuadamente los polipéptidos no modificados e incluye las modificaciones introducidas en dichos polipéptidos. Como se explicó anteriormente, cada polipéptido contiene un dominio de proteasa modificado y puede incluir residuos adyacentes adicionales de los polipéptidos no modificados correspondientes a los SEQ ID NO: 1, 3, 4 y 6. Reescribir las reivindicaciones para incorporar un SEQ ID NO específico para cada combinación posible de polipéptido modificado implicaría añadir miles de nuevas secuencias a la lista de secuencias, lo cual resulta innecesario y excesivamente restrictivo.

Por otra parte, el solicitante desea aclarar que el dominio de proteasa representa la región funcional clave, y todos los polipéptidos u-PA modificados comprenden al menos dicho dominio modificado, junto con posibles residuos adicionales hasta alcanzar la longitud completa del u-PA. La referencia a las secuencias de polipéptidos no modificados en las que se introducen los dominios de proteasa modificados permite una descripción clara y completa de los polipéptidos reivindicados, sin necesidad de enumerar por separado miles de SEQ ID NO. En su versión modificada, la reivindicación 15 (ahora reivindicación 12) identifica los SEQ ID NO correspondientes a los dominios de proteasa u-PA modificados que contienen las cadenas de mutaciones descritas en la reivindicación 1. Por ende, es claro la caracterización estructural de los polipéptidos haciendo clara la caracterización y modificaciones de la reivindicación 8 dependiente de la reivindicación 1. En ese sentido amablemente se solicita dar por superada la presente objeción.

5.9 El examinador indica que la reivindicación 9 carece de claridad y sustento ya que algunas combinaciones de sustituciones en esta reivindicación no se encuentran en la descripción, ya que solo se evidencian dos variantes específicas. Se sugiere restringir la reivindicación únicamente a aquellas versiones con respaldo en el capítulo descriptivo.

Tal como se expuso en relación con la reivindicación 1, la sustitución del residuo natural C122 por serina (C122S) es completamente opcional y no afecta la actividad del dominio proteasa. Esta enseñanza se encuentra claramente descrita en la solicitud. A lo largo de la misma, se detalla que los polipéptidos u-PA modificados pueden incluir o no dicha sustitución. La inclusión de la modificación C122S tiene como finalidad reducir la agregación, particularmente en condiciones in vitro, ya que el residuo C122 corresponde a una cisteína libre que puede formar enlaces con otras cisteínas libres en distintas moléculas.

La sustitución por serina no altera la actividad enzimática del polipéptido, incluida su capacidad para escindir C3. Como se indica en la solicitud, esta modificación es útil para minimizar la agregación, especialmente cuando u-PA se encuentra en forma de cadena única; sin embargo, no es esencial. En consecuencia, estas consideraciones también aplican plenamente a la reivindicación 9, por lo que respetuosamente se solicita considerar superada la objeción correspondiente.

5.10 El examinador objetas las reivindicaciones 10 a 12 por carecer de claridad considera que las secuencias SEQ ID NO: 1-6 no caracterizan al polipéptido modificado, ya que corresponden al polipéptido de u-PA no modificado. Por tanto, se requiere identificar el polipéptido modificado con su correspondiente SEQ ID NO conforme a la descripción.

En este sentido, el solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del examinador, ya que cada una de las antiguas reivindicaciones 10 a 12 (actualmente reivindicaciones 7 a 9) define los polipéptidos no modificados y especifica las modificaciones introducidas en dichos polipéptidos. Tal como se indicó previamente, cada polipéptido incluye un dominio de proteasa modificado, y puede además comprender residuos de aminoácidos contiguos adicionales provenientes de los polipéptidos no modificados descritos en los SEQ ID NO: 1, 3, 4 y 6.

Reescribir las reivindicaciones para incluir un identificador de secuencia (SEQ ID NO) para cada posible polipéptido dentro del alcance de las reivindicaciones implicaría agregar miles de secuencias adicionales a la lista de secuencias, lo cual resulta innecesario y excesivamente oneroso. Cabe señalar que el dominio de proteasa representa la región funcional clave, y todos los polipéptidos u-PA modificados comprenden al menos un dominio de proteasa modificado junto con residuos adicionales que pueden extenderse hasta cubrir la longitud completa de u-PA.

Por lo tanto, al referirse en las reivindicaciones a las secuencias de los polipéptidos no modificados en los que se introducen los dominios de proteasa modificados con las sustituciones definidas, se logra una descripción completa y clara de los polipéptidos modificados reivindicados, sin la necesidad de enumerar miles de SEQ ID NO de forma individual. En apoyo de lo anterior, la reivindicación 15, en su forma enmendada (ahora reivindicación 12), identifica expresamente los SEQ ID NO correspondientes a los dominios de proteasa u-PA modificados con las cadenas de mutación recitadas en la reivindicación 1.

5.11 El examinador objeta la reivindicación 13 debido a que no es clara y carece de sustento porque menciona combinaciones de sustituciones sin indicar su SEQ ID NO correspondiente, lo cual impide identificar el polipéptido de forma inequívoca. También señala que la redacción incluye resultados a alcanzar que no caracterizan técnicamente al polipéptido. Además, se menciona que "C122S es C122C", lo cual no tiene respaldo en la descripción, ya que todos los polipéptidos divulgados contienen la sustitución C122S. Se sugiere incluir únicamente materia respaldada por la descripción y reemplazar los resultados a alcanzar por características técnicas esenciales. El examinador objeta la reivindicación 14 por carecer de claridad y sustento, ya que incluye una combinación de sustituciones (sin C122S) que no está divulgada en la descripción. También falta el SEQ ID NO correspondiente. Se sugiere eliminar materia sin respaldo y citar el SEQ ID NO del polipéptido reclamado conforme a la descripción.

Tal como se expuso en relación con la reivindicación 1, la sustitución del residuo natural C122 por serina (C122S) es opcional y no afecta la actividad del dominio de proteasa. Esta enseñanza se encuentra claramente descrita en la presente solicitud. A lo largo de la misma se detalla que los polipéptidos u-PA modificados pueden incluir o no dicha sustitución. El reemplazo C122S se introduce con el fin de reducir la agregación, en particular durante experimentos in vitro, ya que el residuo C122 corresponde a una cisteína libre que puede formar enlaces disulfuro con otras moléculas.

En consecuencia, esta aclaración aplica igualmente a las reivindicaciones 13 y 14. Se solicita respetuosamente considerar superada la presente objeción.

5.12 El examinador objeta la reivindicación 15 por carecer de claridad porque depende de reivindicaciones que no incluyen las secuencias mencionadas. Además, incorpora características técnicas esenciales que deberían estar en la reivindicación independiente. También se objeta que carece de sustento al mencionar "las

mismas secuencias, excepto que C122 es C", ya que todas las divulgadas tienen C122S. Se sugiere reclamar solo materia sustentada y ajustar la dependencia de forma coherente.

Para abordar el rechazo, se ha modificado la antigua reivindicación 15 (ahora reivindicación 12) con el fin de eliminar los SEQ ID NO que no presentan mutaciones coherentes con las cadenas de mutación citadas en la reivindicación 1. Por lo tanto, amablemente se solicita considerar superada la objeción.

5.13 El examinador objeta las reivindicaciones 19 y 20 por carecer de claridad, ya que las secuencias mencionadas no corresponden a SEQ ID NO de polipéptidos modificados. Se sugiere indicar la SEQ ID NO adecuada según la descripción.

En este sentido, el solicitante desea aclarar que las antiguas reivindicaciones 19 y 20 (ahora reivindicaciones 16 y 17) fueron rechazadas por falta de claridad, debido a que las secuencias divulgadas no corresponden con los números de identificación de SEQ de los polipéptidos modificados. Sin embargo, esta objeción es incorrecta. A continuación, se explica cómo se estructura cada reivindicación:

- Reivindicación 16: Depende de la reivindicación 14. Se refiere a un polipéptido u-PA modificado que contiene el dominio de proteasa que se establece en SEQ ID NO:18, donde el dominio de proteasa u-PA no modificado se encuentra en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:5.
- Reivindicación 17: Depende de la reivindicación 12. Se refiere a un polipéptido u-PA modificado que contiene un dominio de proteasa u-PA modificado en la posición C122S, conforme a las modificaciones realizadas en la reivindicación 12.

Por lo tanto, la reivindicación 16 está relacionada con un polipéptido que contiene el dominio de proteasa de SEQ ID NO:18, mientras que la reivindicación 17 hace referencia a un polipéptido con el dominio de proteasa C122S. Ambas reivindicaciones describen correctamente las secuencias de los polipéptidos modificados y no requieren que se asignen números adicionales de SEQ ID NO. En ese sentido amablemente se solicita dar por superada la objeción.

5.14 El examinador objeta las reivindicaciones 21, 22 y 27 ya que se refieren únicamente a resultados a alcanzar que no caracterizan al polipéptido. Por ende,

el examinador sugiere sustituirlos por características técnicas esenciales respaldadas en la descripción.

Dado que la reivindicación 1 define de manera completa las secuencias de todos los polipéptidos dentro de su alcance, las reivindicaciones 21, 22 y 27, que introducen limitaciones funcionales adicionales para los polipéptidos u-PA modificados, son redundantes. Por lo tanto, se proponen para su cancelación, lo que hace que los rechazos relacionados sean discutibles.

5.15 El examinador objeta la reivindicación 28 por carecer de sustento porque menciona conjugación del polipéptido con otra porción o polímero, pero esta materia no está desarrollada en la descripción. Se sugiere limitar la reivindicación a lo efectivamente divulgado.

Así mismo, el examinador objeta las reivindicaciones 29 a 42 debido a que carecen de sustento, ya que no se describe el desarrollo de polipéptidos con esas modificaciones, ni proteínas de fusión, ni con PEGilación. Además, no son claras porque aluden a resultados a alcanzar y no a características técnicas esenciales. Se sugiere eliminar materia no sustentada y redefinir las reivindicaciones con base en lo divulgado.

Finalmente, el examinador objeta las reivindicaciones 44 a 74 por carecer de sustento, ya que no se describe una proteína de fusión que incluya todos los polipéptidos reclamados. Se sugiere hacer las aclaraciones necesarias y limitarse a lo que está debidamente respaldado.

En este sentido, el solicitante respeta y manifiesta su desacuerdo con la opinión del examinador. A lo largo de la solicitud y en los ejemplos proporcionados, se divulga y discute ampliamente el uso de polipéptidos u-PA modificados conjugados con fracciones o polímeros, así como varios tipos de proteínas de fusión u-PA. Estas proteínas conjugadas y de fusión son bien conocidas en la técnica y se preparan de manera rutinaria.

El solicitante no ha inventado la modificación de polipéptidos con polímeros ni la formación de proteínas de fusión; lo que se ha inventado son polipéptidos u-PA modificados que contienen las modificaciones de aminoácidos detalladas en la reivindicación 1 en el dominio de la proteasa. Estas modificaciones aumentan la actividad y/o la especificidad para la escisión de la proteína C3 del complemento. Por

ende, las personas expertas en la materia están completamente familiarizadas con tales polímeros y conjugados.

Como se detalla en la solicitud, los polipéptidos u-PA modificados pueden incluir, además de las modificaciones de aminoácidos primarios, modificaciones postraduccionales y otras modificaciones en u-PA. Estas pueden implicar la conjugación o enlace a otros polipéptidos o fracciones, lo que altera propiedades como la vida media sérica y la resistencia a la proteasa endógena. Dichas modificaciones incluyen, entre otras, la unión a la albúmina, la vinculación a dominios de multimerización y la pegilación. Como se ha discutido a lo largo de la solicitud, estas modificaciones son ampliamente conocidas en el arte y se realizan de forma rutinaria en la terapéutica de proteínas. Por ejemplo, la pegilación y la multimerización son técnicas comunes utilizadas para aumentar la vida media sérica de las proteínas terapéuticas, y muchas formas comerciales de los polipéptidos incluyen estas modificaciones.

El solicitante sostiene que, considerando el conocimiento de los expertos en la materia y las enseñanzas de la solicitud, está dentro de las capacidades de una persona experta modificar aún más los polipéptidos u-PA modificados, aplicando métodos conocidos para incluir modificaciones estructurales y postraduccionales típicas en la terapéutica proteica. Cualquiera de los polipéptidos u-PA modificados puede ser modificado para incluir tales alteraciones, como se expone, por ejemplo, en las páginas 107-108 se divulga:

"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, delecciones 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.”

Varias secciones de la solicitud describen modificaciones estructurales de los polipéptidos, las cuales incluyen ejemplos que disminuyen la inmunogenicidad (Sección A), dominios Fc (Sección B), conjugación a polímeros (Sección C) y dominios de transducción de proteínas (Sección D). También se mencionan la PEGilación (Sección A) y las proteínas de fusión (Sección B), tales como las proteínas de fusión que contienen dominio Fc (subsección A), fusión a albúmina sérica humana (HSA) (subsección B), fusión a un anticuerpo de fragmento de cadena única variable (scFv), como el scFv que se une al colágeno II (C2scFv) (subsección C), fusión a HABD (subsección D, páginas 172-173), y fusión a otros polipéptidos. Además, la solicitud describe polipéptidos de fusión que contienen fracciones de Fc y multímeros formados a partir de ellas, los cuales son bien conocidos en la técnica, tal como se expone en la solicitud.

La solicitud también proporciona ejemplos prácticos sobre la preparación de diversas proteínas de fusión y modificaciones en la secuencia primaria de los polipéptidos u-PA modificados, y su uso (véanse los ejemplos 14-16). El Ejemplo 14 ilustra la clonación, expresión y preparación de las proteínas de fusión u-PA-Albúmina Suero Humana (HSA), mientras que el Ejemplo 15 presenta su farmacocinética después de la inyección intravítrea. Por otro lado, el Ejemplo 16 describe la preparación, administración, actividad, expresión y otras propiedades de una serie de proteínas de fusión (o quiméricas).

En la Sección A (páginas 270 a 271) se describe:

“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 (IgGk) (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 (IgGk) (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 (IgGk); 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.” (Énfasis añadido)

Las secciones B y C del Ejemplo 16 detallan la construcción, las secuencias y la expresión de varias proteínas de fusión. En la sección D se describe la activación de las proteínas de fusión:

“D. Estrategias de activación de proteínas de fusión

Se emplearon varias estrategias para la activación de U-PA. Las proteínas establecidas en SEQ ID NOs: 1004-1005, 1011 y 1015 fueron activadas por plasmina, como se detalla arriba en el Ejemplo 14. Se esperaba que las proteínas establecidas en los NOs SEQ ID: 1010, 1014 y 1016 fueran activadas por la furina intracelular durante la expresión. Se anticipó que la proteína establecida en SEQ ID NO: 1006-1008 se autoactivaría durante la expresión. Las proteínas establecidas en SEQ ID NOs: 1017 y 1018 fueron activadas por el tratamiento con proteasa SUMO. Para activar las construcciones de SUMO-u-PA, normalmente se añadieron 10 unidades de proteasa SUMO por 1 mg de proteína y se dejó incubar durante la noche a 4 °C. Una mayor purificación en una columna de quelación de níquel HisTrap eliminaría efectivamente la fracción de SUMO etiquetada con His.

SEQ ID NO:	Secuencia de activación	Estrategia de activación
1004	uPA wt w/número	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 activación	La escisión de la señal de secreción durante la 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 post expresión
1010	uPA Furin con Cys	Activación de la furina durante la expresión; La activación no es necesaria durante el procesamiento posterior
1011	WT uPA 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; La activación no es necesaria durante el procesamiento posterior
1015	uPA con Cys	Tratamiento con plasmina
1016	Furina sin Cys	Activación intracelular por Furina durante la expresión; La activación no es necesaria durante el procesamiento posterior
1017	SUMO	Tratamiento con proteasa SUMO
1018	SUMO	Tratamiento con proteasa SUMO

“

La sección E describe la actividad de varias proteínas de fusión y muestra que se activan *in vivo* y están activas. En las secciones F y G se describe la preparación de proteínas de fusión y su purificación. En la sección H se detalla la construcción de proteínas de fusión, en particular el empleo de porciones catalíticamente activas de los

polipéptidos u-PA modificados, señales de secreción, socios de fusión, secuencias de activación, enlazadores y otros socios de fusión. Véanse, *por ejemplo*, las Tablas 6 a 9. En la sección I se detallan los ensayos para evaluar las actividades de las proteínas de fusión y las proteínas modificadas. En ese sentido amablemente se solicita dar por superada la presente objeción.

5.16 El examinador objeta la reivindicación 37 ya que carece de claridad y sustento porque incluye secuencias con al menos 90% o 95% de identidad con SEQ ID NO: 50 o 992, sin evidencia en la descripción de polipéptidos con esos niveles de identidad. Esto genera un alcance no respaldado por el solicitante. Se sugiere limitar la reivindicación a lo sustentado en la descripción. Por otra parte, el examinador objeta la reivindicación 43 que no es clara y carece de sustento al mencionar multímeros del polipéptido y secuencias con al menos 99% de identidad, sin que exista evidencia del desarrollo de dichos multímeros en la descripción. Se recomienda incluir solo materia respaldada.

En este sentido, el solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del Examinador. Las antiguas reivindicaciones 37 y 43 (nuevas reivindicaciones 31 y 37, respectivamente), así como las reivindicaciones de las que dependen, describen de manera completa y precisa los polipéptidos dentro del alcance de la invención. En particular, estas reivindicaciones exigen que las modificaciones en los polipéptidos consistan exclusivamente en las modificaciones enumeradas en las reivindicaciones de las que dependen. Asimismo, se especifican todas las combinaciones de modificaciones posibles y se definen claramente los polipéptidos no modificados sobre los que se introducen dichas modificaciones.

Los polipéptidos no modificados consisten en la secuencia establecida en cualquiera de los SEQ ID NOs: 1-6, o en una porción catalíticamente activa que contiene el dominio proteasa definido por los SEQ ID NOs: 2 o 5. Todos los polipéptidos descritos incluyen al menos el dominio de proteasa, y todas las modificaciones se localizan en dicho dominio. Por lo tanto, la secuencia de cada polipéptido queda completamente definida en las reivindicaciones 31 y 37, así como en las reivindicaciones de las que dependen.

En su forma enmendada, las reivindicaciones relevantes son:

- Reivindicación 31: El polipéptido u-PA modificado de la reivindicación 30, en el que el dominio Fc comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 50 o SEQ ID NO: 992.

- Reivindicación 37: El polipéptido u-PA modificado de la reivindicación 36, que comprende la secuencia de residuos de aminoácidos establecida en cualquiera de los SEQ ID NOs: 1001-1003 y 1024-1029, así como multímeros de los mismos.

La reivindicación 31 se refiere a polipéptidos u-PA modificados que contienen un dominio de multimerización del tipo Fc, cuya secuencia está definida en los SEQ ID NO: 50 (Fc de hIgG1) y SEQ ID NO: 992 (fragmento Fc de la cadena pesada de IgG1 humana). La reivindicación 37, por su parte, presenta SEQ ID NOs ejemplares para proteínas de fusión u-PA.

Con el fin de atender los rechazos planteados por el Examinador y facilitar el enjuiciamiento, se han modificado las reivindicaciones para eliminar las referencias al porcentaje de identidad de secuencia.

El solicitante sostiene respetuosamente que las proteínas de fusión descritas en las reivindicaciones 31 y 37 están suficientemente respaldadas en la solicitud, tanto en cuanto a su estructura como a los métodos de preparación. Además, los polipéptidos no proteasa empleados en dichas fusiones incluyen dominios conocidos en la técnica por conferir propiedades farmacológicas deseables, tales como:

- Dominios de multimerización (p. ej., Fc)
- Dominios de transducción de proteínas (PTD)
- Dominios de unión al ácido hialurónico (HABD)
- Anticuerpos dirigidos a antígenos específicos.

Como se indicó, SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 992 representan secuencias Fc ejemplares ampliamente conocidas en el estado de la técnica. El solicitante no reclama la invención de estas secuencias, sino la incorporación de las mismas en proteínas de fusión que incluyen un polipéptido u-PA modificado, lo cual constituye una práctica rutinaria y bien establecida en el desarrollo de terapéuticos proteicos.

Por ejemplo, en la solicitud se establece en la página 168, línea 30 a la página 111, lo siguiente:

"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 5 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)”

Las secuencias incluidas en la solicitud están presentadas de manera que una persona experta en la materia puede, sin dificultad, obtener proteínas de fusión que contienen dominios Fc, incluso con cierto grado de variación en la secuencia. Un profesional con conocimientos técnicos adecuados, al revisar la descripción y considerando el conocimiento general en la técnica, estaría en capacidad de producir las proteínas de fusión reivindicadas.

La solicitud proporciona respaldo experimental concreto. Por ejemplo:

- Ejemplo 14 describe la clonación, expresión y preparación de proteínas de fusión que comprenden polipéptidos u-PA modificados unidos a albúmina sérica humana (HSA).
- Ejemplo 16 presenta otras proteínas de fusión que contienen polipéptidos u-PA modificados fusionados con diferentes socios, ya sea en el extremo N-terminal o C-terminal.

Una tabla presentada en las páginas 273-274 (reproducida a continuación) resume los distintos constructos generados, incluidos aquellos que contienen dominios Fc de IgG1.

Además, el Ejemplo 16 detalla minuciosamente:

- La preparación de los constructos de fusión con u-PA,
- La transformación y expresión de las proteínas de fusión,
- La activación enzimática de las proteínas de fusión,
- La medición de su actividad sobre C3,
- La purificación de las proteínas de fusión resultantes.

Las características y resultados obtenidos para estas proteínas de fusión se resumen en mayor detalle en las tablas de las páginas 271 a 295 de la descripción.

Constructos de fusión ejemplares

SEQ ID NO:	Secuencia de señal	Compañero de fusión	Secuencia de activación	Ubicación del compañero de Fusión	Dominio proteasa de u-PA
1004	IgGk	IgG1 Fc	u-PA con Cys	N-terminal	SEQ ID NO: 987

SEQ ID NO:	Secuencia de señal	Compañero de fusión	Secuencia de activación	Ubicación del compañero de Fusión	Dominio proteasa de u-PA
1005	IgGk	Sin socio de fusión	UPA de longitud completa con Cys	Sin socio 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	IgGk	IgG1Fc	u-PA furina sin Cys	C-terminal	SEQ ID NO: 21
1011	IgGk	IgG1Fc	UPA de 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
1014	IgGk	HSA	furina con Cys	C-terminal	SEQ ID NO: 987
1015	IgGk	HSA	u-PA con Cys	C-terminal	SEQ ID NO: 987
1016	IgGk	HSA	furina sin Cys	C-terminal	SEQ ID NO: 21
1017	IgGk	HSA	SUMO	C-terminal	SEQ ID NO: 21
1018	IgGk	IgG1 Fc	SUMO	C-terminal	SEQ ID NO: 21

Las proteínas de fusión que incluyen polipéptidos u-PA modificados pueden incorporar señales de secreción, socios de fusión como fragmentos de anticuerpos, dominios de multimerización o albúmina sérica, secuencias de activación y/o enlazadores, entre otros componentes. La solicitud proporciona secuencias de aminoácidos ejemplares para cada uno de estos elementos.

Cabe destacar que estos componentes adicionales no modifican la secuencia de aminoácidos del polipéptido u-PA modificado; simplemente forman parte del constructo general empleado para generar la proteína de fusión. Por lo tanto, las reivindicaciones correspondientes dependen correctamente de la reivindicación 1, dado que el polipéptido u-PA modificado presente en la proteína de fusión cumple con todos los requisitos definidos en dicha reivindicación.

Como se explicó previamente, los ejemplos 15 y 16 respaldan la preparación, modificación, expresión y caracterización de estas proteínas de fusión.

Adicionalmente, otras modificaciones, como la pegilación, son ampliamente conocidas por los expertos en la materia. La solicitud detalla este tipo de modificaciones en las páginas 151 a 153, incluyendo los reactivos utilizados y sus aplicaciones. En particular, en la página 152 se incluye una extensa lista de publicaciones que evidencia el conocimiento técnico consolidado en esta área.

"(véase, por ejemplo, Monfardini et al., Bioconjugate Chem. 6:62-69, 1995; Veronese y cols., J. Polímeros Bioactivos Compatibles 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 dólares; 5.643.575 dólares; 5.766.581 dólares; 5.795.569 dólares; 5.808.096 dólares; 5.900.461 dólares; 5.919.455 dólares; 5.985.263 dólares; 5.990 y 237 dólares estadounidenses; 6.113.906 dólares estadounidenses; 6.214.966 dólares estadounidenses; 6.258.351 dólares estadounidenses; 6.340.742 Estados Unidos; 6.413.507 dólares estadounidenses; 6.420.339 dólares 6.437.025 dólares; 6.448.369 dólares estadounidenses; 6.448.369 dólares EE.UU. 6.461.802; 6.828.401 dólares; 6.858.736 dólares; Estados Unidos 2001/0021763; Estados Unidos 2001/0044526; Estados Unidos 2001/0046481; Estados Unidos 2002/0052430; Estados Unidos 2002/0072573; Estados Unidos 2002/0156047; Estados Unidos 2003/0114647; Estados Unidos 2003/0143596; Estados Unidos 2003/0158333; Estados Unidos 2003/0220447; Estados Unidos 2004/0013637; Estados Unidos 2004/0235734; WO0500360; Estados Unidos 2005/0114037; Estados Unidos 2005/0171328; Estados Unidos

2005/0209416; EP 01064951; EP 0822199; WO 00176640; WO 0002017; WO 0249673; WO 9428024; y WO 0187925).”

La pegilación es rutinaria para los diestros en el arte. Muchos polipéptidos terapéuticos están pegilados, generalmente para aumentar la vida media sérica. En ese sentido amablemente se solicita dar por superada la presente objeción.

5.17 El examinador objeta la reivindicación 75 por carecer de claridad y sustento, porque menciona una molécula de ácido nucleico caracterizada únicamente por la proteína que codifica, lo cual no es una definición técnica válida. Además, no se evidencia la inclusión de ácidos nucleicos que codifiquen proteínas de fusión en la descripción. Se sugiere reformular y ceñirse al contenido divulgado.

El solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del examinador, ya que la antigua reivindicación 75 (actualmente reivindicación 69) y sus reivindicaciones dependientes abarcan las características técnicas esenciales establecidas en las reivindicaciones de las que dependen. Por ejemplo, el ácido nucleico reivindicado codifica necesariamente un polipéptido u-PA modificado que presenta una mayor afinidad de unión y escisión de la proteína C3 del complemento, en comparación con el u-PA de tipo salvaje.

La descripción de la solicitud detalla explícitamente la construcción y generación de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos u-PA modificados, así como proteínas de fusión que los contienen. Véase, por ejemplo, la página 135, sección F, titulada *“Métodos de producción de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos u-PA modificados”*.

Por ende, una persona versada en la materia o incluso alguien con conocimientos básicos de biología molecular, comprendería el código genético y, partiendo de la secuencia de aminoácidos, sería capaz de generar sin dificultad un ácido nucleico que codifique la proteína deseada. La solicitud incluye, además, una secuencia ejemplar de ácido nucleico correspondiente al propéptido u-PA (véase SEQ ID NO:46). El personal experto también podrá utilizar codones degenerados equivalentes a los establecidos en la Lista de Secuencias, conforme a las prácticas comunes en la técnica. En ese sentido amablemente se solicita dar por superada la presente objeción.

5.18 El examinador objeta las reivindicaciones 76 a 83 porque carecen de sustento debido a que mencionan distintos tipos de vectores (procariotas, eucariotas,

virales, de levadura, insectos, expresión y terapia génica) que no están desarrollados en la descripción. Se recomienda ajustar el alcance a lo descrito.

No estamos de acuerdo, la especificación detalla varios tipos de vectores de expresión, incluidos todos los cuales se describen en las reivindicaciones 76-83. Los vectores y las células que componen vectores se conocen e implementan desde hace mucho tiempo en la expresión recombinante de proteínas, véase, por ejemplo, la página 141-142:

"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/traduccionales 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 (Herrera-Estrella et al., Nature 303:209-213 (1984)) o el promotor del ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor (Gardner et al., Nucleic Acids Res. 9:2871 (1981)), y el promotor de la enzima fotosintética ribulosa bisfosfato carboxilasa (Herrera-Estrella et al., 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 al., 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 al., 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))."

Los vectores de expresión utilizados para la producción de polipéptidos deseados o proteínas de fusión son bien conocidos en el estado de la técnica. Desde la década de 1970 se han desarrollado vectores de expresión, y ya en la década de 1980 existía una amplia disponibilidad y uso de vectores tanto procariotas como eucariotas, incluidos vectores para sistemas de expresión en insectos, entre otros.

El uso de estos vectores se ha consolidado como una práctica estándar en el campo, y su selección depende de las propiedades específicas deseadas para la expresión, parámetros que son ampliamente comprendidos por las personas expertas en la materia. En este contexto, la selección y utilización de un vector adecuado para la expresión de un polipéptido u-PA modificado o una proteína de fusión que lo contenga no representa una carga indebida de experimentación.

Por lo tanto, se solicita respetuosamente que esta objeción sea considerada superada.

5.19 El examinador objeta la reivindicación 85 porque no es clara, ya que menciona *"una línea de células no humanas"* sin especificar a qué se refiere exactamente. Se sugiere hacer las aclaraciones pertinentes basadas en la descripción.

En ese sentido el solicitante desea aclarar describe varias células y líneas celulares para su uso como vectores de expresión, por ejemplo, la especificación describe las *células procariotas* en la página 146:

"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 bien conocida por los expertos en la técnica;"

células de levadura, en la página 147:

"Las levaduras tal como Saccharomyces cerevisiae, 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"

insectos y líneas celulares de insectos en la página 147:

" Las células de insecto, particularmente usando expresión de baculovirus, son útiles para expresar polipéptidos tal como polipéptidos de u-PA (...) Los sistemas de baculovirus comúnmente utilizados incluyen los baculovirus como el virus de la poliedrosis nuclear Autographa californica (AcNPV) y el virus de la poliedrosis nuclear Bombyx mori (BmNPV) y una línea celular de insectos como Sf9 derivada de Spodoptera frugiperda, Pseudaletia unipuncta (A7S) y Danaus plexippus (DpN1);"

y *líneas celulares de mamíferos* en la página 155, líneas 10-15:

"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."

Sin embargo, para mayor claridad, la afirmación se modifica para recitar líneas celulares específicas.

5.20 El examinador objeta la reivindicación 96 por carecer de claridad y sustento, ya que se refiere a un método que introduce un ácido nucleico o vector sin caracterizar técnicamente dicho ácido nucleico. Además, no se evidencia el desarrollo de métodos ni de ácidos nucleicos que codifiquen proteínas de fusión. Se recomienda realizar ajustes y ceñirse a la descripción.

El solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la objeción formulada, dado que la antigua reivindicación 96 (actualmente reivindicación 89), así como sus reivindicaciones dependientes, incorporan las características técnicas esenciales descritas en las reivindicaciones de las que dependen. En particular, el ácido nucleico reivindicado codifica un polipéptido u-PA modificado que, necesariamente, presenta una mayor afinidad de unión y capacidad de escisión sobre la proteína C3 del complemento, en comparación con el ácido nucleico que codifica el u-PA de tipo silvestre.

La descripción de la solicitud proporciona instrucciones claras y detalladas sobre la construcción y generación de ácidos nucleicos que codifican tanto los polipéptidos u-PA modificados como sus correspondientes proteínas de fusión. Véase, por ejemplo, la sección F de la descripción (página 141), titulada *"Métodos de producción de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos u-PA modificados y derivados de los mismos."*

La persona experta en la materia, familiarizada con el código genético, es capaz de diseñar sin dificultad un ácido nucleico a partir de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de interés. Incluso un individuo con conocimientos básicos de biología molecular, como los adquiridos a nivel escolar, comprendería cómo generar una secuencia de ácido nucleico codificante a partir de la secuencia de una proteína. La solicitud proporciona además una secuencia ejemplar de ácido nucleico del propéptido u-PA (véase SEQ ID NO:46), y la persona experta podría fácilmente sustituir codones por otros codones sinónimos o degenerados de acuerdo con la Lista de Secuencias.

Por tanto, se considera que las reivindicaciones están plenamente respaldadas por la descripción y que la objeción planteada debe considerarse superada.

5.21 El examinador objeta las reivindicaciones 99 a 102 porque carecen de claridad y sustento porque no se evidencia en la descripción el desarrollo de composiciones farmacéuticas que contengan una proteína de fusión o un ácido nucleico. Se recomienda reclamar solo lo sustentado en el texto descriptivo.

El solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la objeción planteada. Las composiciones farmacéuticas que comprenden polipéptidos u-PA modificados se describen adecuadamente en la solicitud y pueden formularse siguiendo métodos bien establecidos en la técnica. Tal como se ha discutido previamente, la solicitud ejemplifica de forma detallada la preparación de proteínas de fusión, su expresión, y su introducción en células y modelos animales, demostrando así tanto su expresión como su actividad biológica.

La solicitud proporciona secuencias de u-PA no modificados, así como vectores que codifican distintas proteínas de fusión, incluyendo las secuencias completas de todos los polipéptidos comprendidos en el alcance de las reivindicaciones. La persona experta en la materia, con conocimiento del código genético, puede reemplazar codones por codones degenerados equivalentes y/o introducir codones que codifican los aminoácidos modificados, conforme a la técnica común.

Como ya se ha mencionado, la preparación de las proteínas de fusión se detalla exhaustivamente en la solicitud y su actividad biológica in vivo queda demostrada. El Ejemplo 14 describe la clonación, expresión y preparación de proteínas de fusión entre u-PA modificado y albúmina sérica humana (HSA), mientras que el Ejemplo 15 ejemplifica su farmacocinética tras la administración intravítrea. El Ejemplo 16 proporciona detalles adicionales sobre la preparación, administración, expresión y evaluación funcional de una variedad de proteínas de fusión.

En consecuencia, la solicitud describe de forma suficiente tanto la preparación como la funcionalidad de las proteínas de fusión reivindicadas. Es práctica común en el estado de la técnica formular proteínas para su administración en composiciones farmacéuticas, y la solicitud proporciona ejemplos representativos de dichas composiciones. Además, la descripción incluye una sección dedicada específicamente a las composiciones farmacéuticas. Véase, por ejemplo, la descripción desde la página 170:

"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.”

La descripción proporciona detalles adicionales relevantes, incluyendo la preparación y administración de polipéptidos u-PA modificados, así como formulaciones ejemplares por diferentes vías de administración. Asimismo, se describen métodos de administración de ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos modificados. Véase, por ejemplo, la subsección 2, desde la página 175 hasta la página 179 de la descripción.

En relación con las reivindicaciones dirigidas a ácidos nucleicos que codifican polipéptidos u-PA modificados, se destaca que dichas reivindicaciones abarcan las características técnicas esenciales descritas en las reivindicaciones de las que dependen. Por ejemplo, el ácido nucleico reivindicado que codifica un u-PA modificado codifica necesariamente un polipéptido con mayor capacidad de unión y escisión de la proteína C3 del complemento, en comparación con el ácido nucleico que codifica el u-PA de tipo salvaje.

La solicitud describe de forma específica la construcción y generación de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos u-PA modificados, así como proteínas de fusión que

los comprenden. Véase, por ejemplo, la sección F de la página 141, titulada "Métodos de producción de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos u-PA modificados".

En consecuencia, las composiciones farmacéuticas que comprenden polipéptidos u-PA modificados y los ácidos nucleicos que los codifican están adecuadamente descritas y respaldadas en la solicitud. Por lo tanto, se solicita respetuosamente que la presente objeción sea considerada superada.

5.22 El examinador objeta la claridad del capítulo reivindicatorio ya que señala que no es claro porque los elementos esenciales de la invención están distribuidos en diferentes reivindicaciones en lugar de concentrarse en una reivindicación independiente. Se sugiere replantear el capítulo para que la reivindicación principal incluya todas las características técnicas esenciales de la invención.

El solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo. La reivindicación 1 se refiere a modificaciones y combinaciones de modificaciones de polipéptidos u-PA ejemplares, y define de manera completa los polipéptidos que se encuentran dentro del alcance de la invención. Todas las reivindicaciones dependientes incorporan expresamente las limitaciones establecidas en la reivindicación 1, así como las establecidas en la reivindicación adicional de referencia.

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.

6. 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.

Objeciones del examinador:

El examinador señala que el capítulo descriptivo de la solicitud no divulga la invención de manera suficientemente clara y completa como lo exige el artículo 28 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, ya que una persona versada en la materia no podría reproducirla sin un esfuerzo desproporcionado. En primer lugar, la descripción hace referencia a que el dominio Fc comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:

50 o 992, o una forma que tiene al menos 90% o 95% de identidad con dichas secuencias, sin embargo, no se evidencia el desarrollo de polipéptidos con esas variantes. Esto genera una carga excesiva para el experto, al no poder establecer con certeza cuáles variantes están comprendidas y si conservan los efectos técnicos descritos.

Asimismo, se mencionan proteínas de fusión, polipéptidos pegilados, conjugados, composiciones que los comprenden y combinaciones de polipéptidos, pero no se describe su desarrollo experimental ni se presentan ejemplos que permitan su reproducción, por lo cual no es posible extrapolar los efectos técnicos reportados a estas variantes ni ejecutarlas sin inventiva adicional. La misma deficiencia ocurre con la mención genérica a modificaciones del polipéptido como sustituciones, deleciones o inserciones. Aunque se reportan ejemplos con sustituciones, no se evidencia la existencia de polipéptidos que incluyan deleciones o inserciones, y, por tanto, no hay sustento suficiente para su reivindicación.

Además, todas las secuencias descritas contienen la modificación C122S, y no se demuestra que alguna mantenga el residuo de cisteína (C122C). Reclamar variantes con C122C implica abrir el alcance a polipéptidos no explorados, lo cual carece de sustento técnico y pone una carga indebida sobre el lector experto. Finalmente, tampoco se describe la obtención de proteínas de fusión ni la adición de dominios funcionales tales como polímeros, etiquetas, dominios de multimerización o transducción, lo cual vuelve insuficiente la descripción para sustentar reivindicaciones relacionadas con estas modificaciones estructurales.

Argumento de la solicitud:

En este sentido, el solicitante desea manifestar respetuosamente su desacuerdo con la opinión del examinador. No obstante, con el fin de contribuir al avance del examen, se ha decidido eliminar las referencias a porcentajes de identidad en las reivindicaciones. Cabe señalar que la solicitud proporciona datos experimentales sobre aproximadamente 900 polipéptidos, incluyendo todos aquellos que demuestran actividad (véase la Tabla 14). La reivindicación 1, en su forma actual, define de manera completa todos los polipéptidos comprendidos dentro de su alcance. En particular, los polipéptidos que contienen las combinaciones de modificaciones citadas en la solicitud han demostrado tener actividad escindente sobre la proteína del complemento C3. Es importante destacar que el u-PA no modificado no reconoce al C3 como sustrato, lo cual establece una distinción técnica clara respecto del estado de la técnica.

Todos los polipéptidos reivindicados fueron identificados mediante un ensayo específico que selecciona únicamente aquellos capaces de escindir el sustrato objetivo. En dicho ensayo, la secuencia del sustrato objetivo (C3) se presenta en un polipéptido trampa de proteasa, como una serina modificada. Una vez que el polipéptido reconoce la secuencia objetivo, queda covalentemente capturado. Solo aquellos polipéptidos con afinidad funcional por el sustrato son retenidos, secuenciados y posteriormente evaluados experimentalmente para confirmar su capacidad de escisión sobre C3.

La solicitud incluye cientos de ejemplos funcionales en los que se demuestra que los polipéptidos reivindicados no solo escinden C3, sino que lo hacen con mayor actividad y/o especificidad que el u-PA no modificado. Las reivindicaciones modificadas se limitan expresamente a aquellos polipéptidos que comprenden las modificaciones descritas y que han demostrado poseer la actividad deseada, sin requerir experimentación adicional.

En vista del número significativo de ejemplos funcionales y del nivel de detalle técnico proporcionado, un experto en la materia podría fabricar y utilizar los polipéptidos comprendidos en las reivindicaciones sin incurrir en una carga excesiva de ensayo y error. Por tanto, no se requiere que el experto explore experimentalmente todas las posibles combinaciones de secuencias o modificaciones para reproducir la invención. Asimismo, todas las modificaciones y dominios de proteasa que contienen dichas modificaciones fueron probados y se describen en la solicitud en relación con su capacidad para escindir C3. Las reivindicaciones que hacen referencia a identidad de secuencia, proteínas de fusión, inserciones, deleciones y la mutación C122C han sido discutidas y/o modificadas en secciones anteriores de este documento (véanse los respectivos encabezados en la sección de Reivindicaciones).

Las observaciones y modificaciones presentadas abordan tanto los rechazos del examinador a las reivindicaciones como a la descripción, lo que hace que dichas objeciones resulten superadas. En consecuencia, la materia divulgada en la descripción se relaciona ahora de forma más estrecha y coherente con la materia definida en las reivindicaciones, cumpliendo con los requisitos legales establecidos en la Decisión Andina 486.

7. Unidad de Invención

El examinador sostiene que la solicitud no cumpliría con el requisito de unidad de invención, al considerar que el elemento común entre las distintas invenciones reclamadas, un polipéptido activador de plasminógeno tipo uroquinasa modificado (u-PA), habría sido anticipado por el documento US20060142195A1 y por 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*. En consecuencia, el examinador indica que la solicitud abarca cuatro grupos inventivos distintos, correspondientes a cuatro variantes diferentes del polipéptido u-PA modificado.

Además, el examinador argumenta que no todas las secuencias modificadas incluyen la sustitución específica V41R. Por ejemplo, secuencias como SEQ ID NO: 824, 373, 957, 374 y 823, entre otras, no contienen necesariamente dicha sustitución. Con base en ello, mantiene que no existe un concepto técnico común suficientemente unificador y que las reivindicaciones siguen agrupando materias distintas.

No obstante, la solicitante considera que el rechazo por falta de unidad presenta errores. Las reivindicaciones ya han sido modificadas para ajustarse al Grupo Inventivo 1, el cual incluye polipéptidos u-PA modificados que comprenden la sustitución V41R, así como proteínas de fusión y composiciones que los contienen. Todas aquellas reivindicaciones que anteriormente no eran coherentes con dicho grupo han sido ajustadas en esta presentación con el fin de atender la objeción.

En consecuencia, los polipéptidos actualmente reivindicados comparten un concepto técnico unificador, la sustitución V41R, que no ha sido revelado en los documentos citados del estado de la técnica.

Por lo tanto, la solicitud cumple con lo dispuesto en el Artículo 25 de la Decisión 486, y se solicita respetuosamente que se retire la objeción por falta de unidad de invención.

8. Nivel inventivo

El examinador ha indicado que las reivindicaciones 1 a 22, 27 a 83, 85 y 96 a 102 carecerían de nivel inventivo en vista de las enseñanzas del documento D1 (US20060142195A1) y D3 (JP2009512451).

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 considera que el documento D1 constituye 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 (u-PA) modificado que incluye una o más sustituciones de aminoácidos (L420A, L420E, S421G, etc.), así como la SEQ ID NO: 2 con modificaciones específicas en el bucle de autólisis (Val420, Thr421, Asp422 y Ser423). Estas modificaciones confieren una especificidad a fibrina 500 veces mayor que la uroquinasa silvestre.

La invención, sin embargo, reivindica un polipéptido no modificado con SEQ ID NO: 1 a 6, que incluye la modificación V41R y hasta 17 modificaciones adicionales. Según el examinador, no se demuestra que estas diferencias generen un efecto técnico adicional o inesperado respecto a D1, ni que aporten mejoras funcionales respecto a las ya descritas. Tampoco se evidencia un efecto técnico asociado al residuo C122C, a delecciones, inserciones o porciones del polipéptido.

Con base en esto, el problema técnico objetivo sería: *¿Cómo modificar el polipéptido conocido en D1 para obtener un polipéptido alternativo?*

No obstante, el documento D3 ya divulga un polipéptido u-PA con una modificación en la posición 41 (numeración de quimotripsina), además de otras modificaciones opcionales (en posiciones 146, 151, 175, 224). También enseña la codificación genética, vectores, células hospedadoras, formulaciones farmacéuticas y combinaciones con múltiples agentes terapéuticos. Así, el examinador considera que una persona experta tendría motivación para aplicar la enseñanza de D3 sobre D1, haciendo que la

reivindicación 1 resulte obvia y carente de nivel inventivo. En consecuencia, se extiende esta conclusión a las reivindicaciones dependientes 1 a 22, 27 a 83, 85 y 98 a 102.

Respecto a la reivindicación 96, que se refiere a un método para elaborar el polipéptido modificado, el examinador también toma como base D1, que divulga un método para producir un fármaco con u-PA modificado. La diferencia es que la invención incluye una etapa de cultivo celular de una célula que expresa el ácido nucleico que codifica el polipéptido (SEQ ID NO: 1 a 6 con V41R y hasta 17 modificaciones). Pero nuevamente, no se evidencia un efecto técnico adicional.

El documento D3 también anticipa esta solución, al enseñar un método que incluye introducir el ácido nucleico en una célula hospedadora (como *Pichia pastoris*), cultivarla y aislar el polipéptido, el cual puede tener una modificación en la posición 41. Por tanto, el examinador concluye que el método reivindicado carece de nivel inventivo, y extiende esta conclusión a la reivindicación 97, por no aportar características adicionales significativas.

Argumentos del solicitante:

El solicitante en este sentido manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del examinador. Los polipéptidos reivindicados comprenden específicamente las modificaciones indicadas en las reivindicaciones. Todos ellos fueron identificados mediante un ensayo diseñado para seleccionar proteínas capaces de reconocer una proteína diana, que en este caso es la proteína C3 del sistema del complemento. Como se demuestra en la presente solicitud, todos los polipéptidos ejemplificados escinden C3, mientras que la u-PA no modificada no presenta actividad escindente sobre dicha proteína. Por lo tanto, todos los polipéptidos reivindicados exhiben un efecto técnico concreto: la escisión de C3. Además, poseen secuencias únicas que no se describen ni se sugieren en los documentos citados como antecedentes.

La reivindicación 1 define polipéptidos u-PA modificados que contienen una combinación específica de sustituciones. Los efectos de dichas modificaciones sobre la actividad y/o especificidad hacia la proteína C3 del complemento están claramente demostrados en la presente solicitud. En particular, se observa que la u-PA sin modificar presenta una actividad insignificante hacia C3, lo que resalta la importancia técnica de las modificaciones introducidas. Ni el documento D1 ni D3 describen ni sugieren los polipéptidos tal como están definidos en esta solicitud.

El documento D1 se centra en variantes de uroquinasa modificadas para aumentar su especificidad por la fibrina en lugar del fibrinógeno, con el objetivo de reducir la neurotoxicidad en el tratamiento del accidente cerebrovascular. En ningún momento D1 enseña o sugiere polipéptidos diseñados para escindir C3 o inhibir la actividad del sistema del complemento. Su enfoque es la mejora de las propiedades farmacológicas de la u-PA para el tratamiento del ictus, no su ablación funcional ni su redireccionamiento hacia un nuevo sustrato. D1 no proporciona indicios de eliminar la interacción con fibrina ni de redirigir la especificidad de u-PA hacia proteínas del complemento. En particular, D1 no enseña ni sugiere una u-PA modificada que contenga la sustitución V41R, ni ninguna de las demás modificaciones descritas en las reivindicaciones dependientes, ni que presente actividad y/o especificidad frente a C3. El documento D3 se cita por describir modificaciones en el polipéptido MTSP-1, incluyendo una sustitución en la posición 41. Sin embargo, dicha modificación se refiere exclusivamente a MTSP-1 y no guarda relación con u-PA. No existe en D3 sugerencia alguna de que una modificación análoga en la posición 41 de u-PA produzca un efecto similar, ni se enseña su aplicación para conferir actividad frente a C3. Además, D3 no describe ni sugiere ninguna de las combinaciones de modificaciones definidas en las reivindicaciones de esta solicitud, ni la obtención de polipéptidos u-PA modificados con especificidad por C3.

En resumen, ni D1 ni D3, de forma individual o en combinación, enseñan o sugieren los polipéptidos u-PA modificados reivindicados, que comprenden combinaciones específicas de sustituciones capaces de conferir actividad escindente dirigida contra C3.

Enseñanza de la Referencia Citada y Diferencias con las Reclamaciones Presentes

1. D1: Publicación de patentes de EE. UU. N° 2006/142195

El documento D1 describe modificaciones de polipéptidos activadores del plasminógeno, específicamente u-PA, con el objetivo de tratar el accidente cerebrovascular mediante la modulación de la coagulación sanguínea y la reducción de la neurotoxicidad. D1 enseña el diseño y uso de variantes de u-PA y t-PA con actividad mejorada sobre su sustrato fisiológico, el plasminógeno, para uso terapéutico en ictus. En este contexto, D1 enseña sustituciones que optimizan la función nativa de u-PA, haciéndolo más eficaz como activador del plasminógeno. En marcado contraste, la presente solicitud se centra en la abolición de dicha actividad nativa y en la redirección de la especificidad enzimática de u-PA hacia un sustrato completamente distinto: la proteína C3 del complemento.

D1 no contiene enseñanza alguna que sugiera la modificación de u-PA para eliminar su actividad sobre el plasminógeno, ni para conferirle especificidad o actividad frente a C3. La uroquinasa modificada descrita en D1 (SEQ ID NO:2 en ese documento) incluye sustituciones en las posiciones 420–423, las cuales aumentan su actividad sobre el plasminógeno en presencia de fibrina. Esta secuencia difiere de las secuencias u-PA utilizadas en la presente solicitud, y las posiciones modificadas en D1 son distintas de las modificadas en las reivindicaciones actuales.

No hay ninguna indicación en D1 de eliminar la actividad nativa de u-PA ni de modificarla para que adquiriera una nueva especificidad por un componente del sistema del complemento. D1 no menciona ni sugiere la sustitución V41R, ni ninguna de las combinaciones de modificaciones descritas en las reivindicaciones actuales. Además, D1 no se refiere en ningún momento a la proteína C3, ni a ninguna proteína del complemento como sustrato o diana terapéutica. Todas las modificaciones descritas en D1 tienen por finalidad mejorar la actividad de u-PA sobre su sustrato nativo, el plasminógeno.

Los polipéptidos u-PA modificados reivindicados en la presente solicitud no sólo pierden su actividad nativa sobre el plasminógeno, sino que adquieren una nueva actividad específica para escindir C3, en particular en un sitio funcional que resulta en su inactivación. Tal actividad fue confirmada experimentalmente: los polipéptidos modificados mostraron una actividad de escisión de C3 superior en órdenes de magnitud (hasta 1000 veces mayor) en comparación con u-PA no modificado, el cual no escinde C3 detectablemente. Además, estos polipéptidos no escinden plasminógeno, lo que confirma la eliminación funcional de la actividad nativa.

D1 afirma que las variantes modificadas de u-PA descritas en ese documento incrementan la activación del plasminógeno en más de 650 veces en presencia de fibrina, en comparación con u-PA tipo salvaje. Esto es diametralmente opuesto al enfoque de la presente solicitud, en la cual u-PA se rediseña para perder actividad sobre plasminógeno y ganar especificidad por C3. No hay ninguna enseñanza en D1 de redirigir la especificidad de u-PA hacia C3 ni de abolir su función fisiológica.

Asimismo, D1 no describe ni sugiere ninguna de las sustituciones de aminoácidos recitadas en las reivindicaciones de esta solicitud, tales como V41R, R35, H37, Y40, D10a, L97b, T97a o H99, ni combinaciones de las mismas. Tampoco proporciona evidencia ni predicción alguna de que tales modificaciones confieran actividad sobre proteínas del complemento, ni que contribuyan a la escisión de C3 en un sitio funcionalmente relevante.

En definitiva, D1 se limita a describir variantes de uroquinasa con mayor actividad sobre su sustrato nativo en presencia de fibrina, en un contexto de tratamiento del ictus. No enseña ni sugiere la posibilidad de modificar u-PA para abolir su actividad fisiológica ni redirigir su especificidad hacia proteínas del sistema del complemento. Por tanto, el contenido de D1 no anticipa ni hace obvia la invención reivindicada.

La presente solicitud, en cambio, demuestra que los polipéptidos reivindicados son capaces de escindir C3 de manera específica y eficiente, representando una nueva aplicación terapéutica en enfermedades mediadas por el complemento, como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) o el retraso en la función del injerto (DGF). Las modificaciones introducidas en estos polipéptidos confieren una actividad específica por C3 que no está presente en u-PA nativo y que no se deriva de manera evidente del estado de la técnica, incluyendo D1.

2. D3: JP-A-2009-512451 (correspondiente a WO 2007/047995)

D3 está dirigido a modificar las proteasas no del complemento para aumentar la especificidad de un sustrato diana o la actividad hacia un sustrato diana, donde el sustrato diana es una proteína del complemento, como, por ejemplo, C2 y/o C3. D3 proporciona una lista de proteínas ejemplares que no son del complemento (véase, página 14, línea 1-15 de D3), pero selecciona y modifica MTSP-1 para la escisión de una proteína del complemento. En los ejemplos de D3, un panel de polipéptidos MTSP-1 modificados se examina mediante ensayos hemolíticos con el fin de identificar aquellos que inhiben la activación del complemento. D3 no proporciona ningún polipéptido de u-PA modificado, ni ningún polipéptido de u-PA modificado con mayor actividad y/o especificidad para C3. D3 no enseña ni puede enseñar ni sugerir ninguno de los reemplazos requeridos en las reclamaciones presentes ni la combinación de modificaciones recitadas, porque D3 no enseña ni sugiere ningún reemplazo en un polipéptido u-PA. D3 no enseña ni puede enseñar el efecto de ninguno de los reemplazos citados con respecto a la actividad de escisión y/o la especificidad de C3.

El número de acceso Uniprot A0A2R9BBQ2 es la entrada UniProt para la forma madura del chimpancé pigmeo de tipo salvaje (Bonobo) u-PA. La porción del dominio proteasa parece ser casi 100% idéntica a SEQ ID NO:2 (dominio de proteasa del uPA humano), excepto que A0A2R9BBQ2 contiene L en el residuo 41. Ninguno de los polipéptidos u-PA modificados declarados comprenden la modificación V41L. La secuencia Uniprot sola

o en cualquier combinación con cualquiera de las referencias adicionales D1-D3 no enseña ni sugiere un u-PA modificado que tenga alguna de las modificaciones reclamadas y una mayor actividad/especificidad para una proteína del complemento que es 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 contiene las modificaciones.

3. La combinación de las enseñanzas de D1 y D3 no enseña, sugiere ni da lugar a ninguno de los polipéptidos inmediatamente reclamados

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente el solicitante afirma que ni D1 ni D3 enseñan o sugieren la modificación V41R, ni ninguna de las combinaciones citadas que se enumeran en las reivindicaciones, ni ninguna modificación que aumente la actividad y/o la especificidad de un polipéptido u-PA modificado para C3, en comparación con un polipéptido u-PA no modificado. D1 y D3 no enseñan ni pueden enseñar ninguno de los reemplazos reclamados, ni las combinaciones de reemplazos en un polipéptido u-PA.

D1 proporciona variantes de uroquinasa con mayor especificidad para la fibrina, en comparación con el 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 ningún reemplazo de u-PA en ninguna de las posiciones citadas, ni D1 enseña ni sugiere ningún polipéptido de u-PA modificado que no escinda el sustrato nativo y, por lo tanto, no tiene uso para el tratamiento del accidente cerebrovascular, ni uno que tenga una mayor actividad y / o especificidad para C3. D3 está dirigido a modificar proteasas no del complemento para aumentar la especificidad o la actividad de un sustrato diana seleccionado para inhibir el complemento, pero no proporciona u-PA modificado para este propósito. En los ejemplos de D3, se genera un panel de polipéptidos MTSP-1 modificados y se prueba para inhibir el complemento según lo evaluado en un ensayo hemolítico. D3 proporciona algunos polipéptidos MTSP-1 modificados, pero no proporciona polipéptidos u-PA modificados para inhibir el complemento. D3 proporciona polipéptidos MTSP-1 modificados que incluyen una modificación en el residuo 41, pero no proporciona polipéptidos u-PA con una modificación en ese residuo. MTSP-1 es una enzima completamente diferente de u-PA. Por lo tanto, la combinación de D1 y D3 no puede enseñar o sugerir los polipéptidos u-PA modificados reclamados instantáneamente que incluyen las combinaciones de modificaciones recitadas.

Los datos de la aplicación instantánea muestran muchos ejemplos de polipéptidos u-PA modificados que escinden e inactivan C3. Cada una de las cadenas polipeptídicas enumeradas en la reivindicación 1 tiene datos experimentales que demuestran al menos su mayor actividad para C3. El ejemplo 13, por ejemplo, demuestra el efecto de cada una de las especies R35Q, H37Y, V41R, R35Q, H37Y, D60aP, L97bA, T97aI y H99Q, que se incluyen entre las combinaciones de modificaciones enumeradas en la reivindicación 1, sobre la escisión C3. Como se muestra en el Ejemplo 13, V41R aumenta la actividad intrínseca anti-C3 y la actividad anti-C3 en el 80% del plasma humano en aproximadamente 25-27 veces. V41R en combinación con las modificaciones enumeradas en las reivindicaciones escinde la proteína C3 del complemento, y lo hace 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 plasmina, el sustrato nativo. Ninguna de las referencias citadas enseña o sugiere estas modificaciones, ni que un polipéptido u-PA modificado con alguna de estas modificaciones haya aumentado la actividad anti-C3 en comparación con un polipéptido u-PA no modificado.

Ni D1 ni D3 enseñan o sugieren ninguno de los reemplazos citados, ni reemplazos conservadores de los mismos, ni ninguna de las combinaciones de modificaciones recitadas, ni las propiedades de los polipéptidos u-PA modificados logradas por ellos, como se discutió anteriormente. No hay ninguna referencia que sugiera un reemplazo en V41R, ni ninguna de las modificaciones de combinaciones citadas enumeradas en las reivindicaciones, en un polipéptido u-PA para alterar la actividad/especificidad de escisión de C3 y, por lo tanto, dar como resultado un polipéptido para inhibir la vía del complemento. Por lo tanto, la modificación V41R, las cadenas de modificaciones enumeradas en la reivindicación 1 y las modificaciones conservadoras de las mismas, no son obvias sobre D1 y D3, solas o en cualquier combinación.

El número de acceso Uniprot A0A2R9BBQ2, la forma madura del chimpancé pigmeo de tipo salvaje (*Bonobo*) u-PA, que incluye una L en el residuo 41, no proporciona ninguna enseñanza o sugerencia, solo o en combinación con D1 y/o D3, que daría lugar a cualquiera de los polipéptidos inmediatamente reclamados, todos los cuales escinden C3, no un plasminógeno. La secuencia Uniprot sola o en cualquier combinación con cualquiera de las referencias adicionales D1-D3 no enseña ni sugiere un u-PA modificado que tenga alguna de las modificaciones reclamadas y una mayor actividad/especificidad para una proteína del complemento que es 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 contiene las modificaciones.

4. Efecto técnico de los polipéptidos reclamados al instante

Los polipéptidos u-PA modificados declarados instantáneamente tienen actividad y especificidad para la escisión de la proteína C3 del complemento y actividad reducida o nula para el sustrato nativo, el plasminógeno. Este efecto técnico se demuestra mediante los datos de la aplicación. La aplicación muestra en los ejemplos de trabajo que los polipéptidos u-PA modificados, como los que comprenden las cadenas de modificaciones enumeradas en las reivindicaciones y que incluyen la modificación de aminoácidos V41R, 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.

Por ejemplo, en el Ejemplo 13, tabla 23 (reproducida a continuación), se cuantifica la escisión de la proteína C3 del complemento sustrato para el *polipéptido u-PA no modificado* (SEQ ID NO:5) y para los polipéptidos U-PA U-PA MODIFICADOS SEQ ID NOs:21-33, con el fin de identificar los efectos técnicos de cada uno de los P/21-33 modificados, con el fin de identificar los efectos técnicos de cada uno de los modelos R35Q, H37Y, R37aE, V38E, T39Y, V41R, D10aP, Y60bQ, T97aI, L97bA, H99Q e Y149R. El ejemplo 13 demuestra específicamente que V41R aumenta la actividad intrínseca anti-C3 y la actividad anti-C3 en el 80% del plasma humano en aproximadamente 25 a 27 veces.

Tabla 23: Propiedades ejemplares de polipéptidos 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 de 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	Y _o	U _n	Q	S	R	19	83	94

22	R	Y	E	E	Y	R	P	Q	Y	U	Q	S	R	51	73	79
23	Q	H	E	E	Y	R	P	Q	Y	U	Q	S	R	46	88	92
24	Q	Y	R	E	Y	R	P	Q	Y	U	Q	S	R	6	87	99
25	Q	Y	E	V	Y	R	P	Q	Y	U	Q	S	R	10	105	103
26	Q	Y	E	E	T	R	P	Q	Y	U	Q	S	R	161	93	108
27	Q	Y	E	E	Y	V	P	Q	Y	U	Q	S	R	519	88	100
28	Q	Y	E	E	Y	R	D	Q	Y	U	Q	S	R	30	93	97
29	Q	Y	E	E	Y	R	P	Y	Y	U	Q	S	R	11	58	61
30	Q	Y	E	E	Y	R	P	Q	T	U	Q	S	R	25	86	92
31	Q	Y	E	E	Y	R	P	Q	Y	L	Q	S	R	155	90	111
32	Q	Y	E	E	Y	R	P	Q	Y	U	H	S	R	92	89	108
33	Q	Y	E	E	Y	R	P	Q	Y	U	Q	S	Y	9	74	99

Los datos establecidos anteriormente en el Ejemplo 13 de la especificación, analizan la contribución de cada modificación de aminoácido a la actividad de escisión de C3 y otras propiedades. En el ejemplo 13 se muestra la contribución de cada modificación a la escisión de C3. Para deconvolucionar el efecto de cada modificación en la actividad de escisión, cada modificación se reemplaza con el residuo de tipo salvaje, 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 modificado 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 no modificado. A cada polipéptido adicional ensayado se le ha eliminado una de las 13

modificaciones y se compara la actividad 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.

La aplicación 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 escinden C3 con alta actividad. La aplicación muestra que el u-PA no modificado **no** escinde C3. Todos los polipéptidos reivindicados escinden C3, lo que demuestra un efecto técnico de los polipéptidos reivindicados.

En la reivindicación 1 se citan más de 400 polipéptidos u-PA modificados ejemplares con una EC50 de menos de 100 nM para la escisión de C3 que contienen las modificaciones. Otros tienen un ED50 más alto, pero aún así se escinden en 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 y no reconocen el sustrato nativo. Por lo tanto, las afirmaciones proporcionan una terapéutica que se puede utilizar para inhibir el complemento a través de la escisión de C3.

La aplicación, por lo tanto, demuestra que u-PA con las combinaciones de modificaciones citadas escinde C3. El u-PA no modificado no escinde C3, ni tampoco el polipéptido u-PA modificado de **D1**. Las modificaciones de u-PA en **D1** mejoran la actividad de escisión para el *sustrato nativo*. Por lo tanto, el u-PA modificado de **D1** es para su uso en el tratamiento del accidente cerebrovascular mediante la alteración de la coagulación, no para el uso en la inhibición del complemento.

Se evaluó la actividad de escisión de cientos de polipéptidos u-PA modificados, incluidos más de 475, incluidos los u-PA de tipo salvaje, 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). El ED50 (dosis efectiva) de polipéptidos u-PA de tipo salvaje y modificados es el requerido 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 proteasa u-PA de tipo salvaje no modificado con la modificación C122S. La modificación C122S se introduce para

prevenir la agregación de proteínas y no afecta a la actividad del u-PA. Los estudios en los ejemplos de trabajo comparan los polipéptidos u-PA modificados con el tipo salvaje u-PA.

Las reivindicaciones citan polipéptidos que comprenden las combinaciones de modificaciones reivindicadas, y la solicitud muestra que todos los polipéptidos reivindicados reconocen un sitio de escisión en C3 y se escinden e inactivan C3. Como se detalla en la solicitud, el efecto técnico del reemplazo C122S es que reduce la agregación de cadenas simples, particularmente para experimentos *in vitro*, no altera la actividad del polipéptido. C122S no es una modificación en la que se base o se afirme la patentabilidad. C122 es una cisteína libre, que puede reaccionar con otras cisteínas libres, lo que conduce a la agregación entre cadenas polipeptídicas individuales. El reemplazo de C por S es una modificación conocida para reducir la agregación de polipéptidos terapéuticos que tienen una cisteína libre que da lugar a la agregación de cadenas polipeptídicas. Se incluyó en los primeros trabajos sobre polipéptidos en aplicaciones y patentes (el coinventor Edwin Madison es inventor de estas aplicaciones y patentes) por la misma razón: para reemplazar una cisteína libre que causa la agregación.

Todos los polipéptidos u-PA modificados, tal y como se afirma en este documento, se seleccionan para reconocer y escindir un sitio diana en una proteína del complemento, en particular C3 para inactivarla, y se examinan para reducir la especificidad/actividad en *sustratos in vivo*, como el plasminógeno. Los polipéptidos dentro del alcance de las reivindicaciones pueden seleccionarse e identificarse mediante cualquier método adecuado de cribado de proteasas. Los polipéptidos u-PA modificados en este documento se identificaron inicialmente utilizando el método de cribado descrito en la Patente de EE. UU. No. 8,211,428, en el que una biblioteca de proteasas modificadas hace reaccionar una serpina que se modifica para incluir una secuencia objetivo en el bucle del sitio reactivo para capturar proteasas modificadas que escindirían dicho objetivo. Las cadenas de modificaciones reivindicadas y su actividad para escindir C3 se muestran en la Tabla 14.

Todos los polipéptidos u-PA modificados, como se afirma, tienen actividad para escindir C3. Los ejemplos 4 y 5, que incluyen las tablas 16 y 17, detallan, respectivamente, la escisión y la estabilidad de varios polipéptidos de u-PA modificados diferentes en humor vítreo. Es bien sabido por un experto en la materia cómo seleccionar modificaciones y combinaciones de modificaciones que puedan transmitir estos y otros efectos técnicos deseables. Además, en la aplicación se detallan los protocolos experimentales que una persona experta en la materia podría realizar para

cuantificar y evaluar la estabilidad y actividad de un polipéptido en humor vítreo que comprenda cualquier otra modificación seleccionada.

A la vista de las anteriores observaciones y modificaciones, las reivindicaciones tienen derecho a inventiva sobre **D1** y **D3**, individualmente o en combinación.

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 D3. Por lo tanto, el objeto reclamado cumple con el requisito de Nivel inventivo establecido en el Art. 18 de la Decisión 486.

9. Conclusión

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

- 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.

10. Anexos

- Nuevo capítulo reivindicatorio conformado por noventa y cinco (95) reivindicaciones.
- Recibo de pago por concepto de modificaciones a las reivindicaciones y pago de nuevo examen.

Señora Directora,


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 comprenden modificaciones en un polipéptido de u-PA no modificado, en donde:

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 el polipeptido u-PA no modificado consiste en una porción 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 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;

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/L97bdeI/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;

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/M157
K/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/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/S146F/M157K/Q192H/K2
43Q

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/Y14
9R;

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/Y15
1L/Q192S;

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

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

R35Q/H37S/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y14
9R;

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;

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;

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/R217E;

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/L97bdeI/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;

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 a 3, 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;

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/R10dS/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;

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

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/L97bdeI/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;

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/R217E;

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/R
217D;
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/M1
57K;
R35Q/H37G/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y14
9R;
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/L97bdeI/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

5. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 1, en donde las modificaciones consisten en modificaciones de aminoácidos corresponden a Y40Q/V41R/L97bA/C122S o Y40Q/V41R/L97bA.

6. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde 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.

7. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 6, en donde el polipéptido no modificado consiste en el polipéptido de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5, el dominio de proteasa.

8. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 6, en donde el polipéptido no modificado consiste en el u-PA maduro de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 6.

9. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 6, en donde el polipéptido no modificado consiste en el pro-péptido de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4.

10. 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/Y

149R;

o

R35L/H37D/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y
149R;

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/Y
149R;

o

R35A/H37G/R37aE/V38E/T39F/V41R/D60aE/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y
149R;

o

R35Q/H37S/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y
149R;

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/Y
149R; o

R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/D97T/T97aE/L97bG/A98S/H
99L/C122S; o

R35Y/H37V/R37aW/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y
151L/Q192T; o

R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y
151L; o

cada una de las anteriores en donde C122S es C122C, por numeración de
quimotripsina.

11. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las
reivindicaciones 1-6 en donde las modificaciones de aminoácidos que
corresponden a

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

149R

o

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

y

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.

12. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el polipéptido de u-PA modificado comprende la secuencia de residuos de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 8-14, 18-21, 23, 24, 28-30, 33, 42, 43, 171, 217-219, 221-225, 230, 231, 242, 260-265, 271-273, 275-292, 300, 311, 324-326, 330, 335, 338-341, 369-370, 382, 398, 399, 401-404, 446, 469, 475, 481, 484, 486, 494-496, 498, 503-505, 507, 509, 511, 513-517, 543, 550, 552, 555, 557, 561, 562, 584, 586, 595, 597, 601, 604, 608, 611-621, 623, 624, 627, 628, 633, 645, 647, 648, 650, 653, 656, 657, 658, 663-671, 673, 675-690, 693, 694, 696, 697, 701-708, 710, 712-715, 717, 718, 720, 722, 724, 726-729, 731-736, 738, 741-744, 746, 748, 750-754, 792, 794-802, 818, 821, 822, 824, 830-832, 834, 835, 868, 869, 872-876, 878, 879, 881, 882, 884, 904, 924-926, 949, 950, 957, 958, 972, 973, 975, 977-984 y 986 o las mismas secuencias, excepto que el residuo en la posición C122 es C (Cys).

13. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el polipéptido de u-PA modificado comprende la secuencia de residuos de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21 o 987.

14. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el polipéptido de u-PA modificado comprende la secuencia de residuos de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 18.

15. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el polipéptido de u-PA no modificado consiste de la secuencia de residuos de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5.

16. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 14, en donde el polipéptido de u-PA no modificado consiste de la secuencia de residuos de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5.

17. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 12, en donde el polipéptido de u-PA no modificado consiste de la secuencia de residuos de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5.

18. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-17 que tiene estabilidad de más de 50% después de la incubación en PBS *in vitro* durante 7 días.

19. 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 *in vitro* durante 7 días.

20. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 18 o reivindicación 19, en donde la incubación se efectúa *in vitro*.

21. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 20, en donde el fluido *in vitro* es humor acuoso.

22. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-21 que se conjuga con otra porción o polímero, ya sea directamente o mediante un ligador.

23. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 22 que es una proteína de fusión.

24. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 22 o reivindicación 23 que está PEGilado.

25. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-24 que comprende un polímero que incrementa la semivida en suero y/o para reducir la inmunogenicidad o ambas.

26 El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 25, en donde el polímero comprende un polipéptido.

27. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 22-26 que se enlaza directa o indirectamente a albúmina de suero.

28 El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 27, en donde la albúmina de suero es una albúmina de suero humano (HSA).

29. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 27 o reivindicación 28, en donde la HSA que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 991.

30. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 28, en donde la porción es un dominio de multimerización que es un dominio Fc.

31. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 30, en donde el dominio Fc comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 50 o SEQ ID NO: 992.

32. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 22-31, en donde el polímero se enlaza directamente al polipéptido de u-PA modificado.

33. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 22-32, en donde el polipéptido o el polímero se enlaza mediante un ligador peptídico al polipéptido de u-PA modificado.

34. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 33, en donde el ligador comprende Gly y/o Ser.

35. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 33 o la reivindicación 34, en donde el ligador contiene hasta 20, 30, 40 o 50 residuos de aminoácidos.

36. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 33 o la reivindicación 35, en donde el ligador comprende (GS) n o (G) n (S) n o (GG) 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.

37. El polipéptido u-PA modificado de la reivindicación 36, 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.

38. Una proteína de fusión, que comprende un polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-37 que se fusiona a un polipéptido de no proteasa o una porción del mismo.

39. La proteína de fusión de la reivindicación 38, en donde el polipéptido de no proteasa es un dominio de multimerización o un dominio de transducción de proteína (PTD).

40. La proteína de fusión de la reivindicación 38, en donde el polipéptido no de proteasa es un dominio de multimerización que es un dominio Fc.

41. La proteína de fusión de la reivindicación 38 que comprende una secuencia de activación de furina.

42. La proteína de fusión de la reivindicación 41, en donde el sitio de activación de furina comprende QSGQKTLRRKR (SEQ ID NO: 996) o QCGQKTLRRKR (SEQ ID NO: 995) o QSGQKTLRRKR (SEQ ID NO: 1044).

43. Una proteína de fusión, que comprende un polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-37, en donde la proteína de fusión comprende una secuencia de señal y el polipéptido de u-PA modificado.

44. La proteína de fusión de la reivindicación 43, en donde la secuencia de señal es de Il-2, u-PA o IgGκ.

45. Una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 38-44, que comprende un compañero de fusión.

46. La proteína de fusión de la reivindicación 45, en donde el compañero de fusión es un dominio de multimerización.

47. La proteína de fusión de la reivindicación 45, 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).

48. La proteína de fusión de la reivindicación 47, en donde el compañero de fusión es un HABD que es gen 6 estimulado por factor de necrosis tumoral (TSG-6).

49. La proteína de fusión de la reivindicación 47, en donde el compañero de fusión es HSA.

50. La proteína de fusión de la reivindicación 47, en donde el compañero de fusión es Fc de IgG.

51. La proteína de fusión de la reivindicación 47, 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.

52. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 38-51, que comprende una secuencia de activación.

53. La proteína de fusión de la reivindicación 52, 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.

54 La proteína de fusión de la reivindicación 52, en donde la secuencia de activación es una secuencia de activación de u-PA o una secuencia de activación de furina.

55. La proteína de fusión de la reivindicación 54, en donde la secuencia de activación tiene la secuencia expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 995-998, 1041 y 1044.

56. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 38-55, que comprende una secuencia de activación, un polipéptido de u-PA modificado y HSA.

57. Una proteína de fusión de la reivindicación 38, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1006, 1007, 1009 y 1010.

58. Una proteína de fusión de la reivindicación 38, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1004-1019 y 1034-1040.

59. La proteína de fusión de la reivindicación 38, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1015 o 1019.

60. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 38-59 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.

61. Una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 38-60 que es una forma activada de dos cadenas que contiene una cadena A y una cadena B.

62. La proteína de fusión de la reivindicación 61, 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.

63. Una proteína de fusión de la reivindicación 61, que comprende un polipéptido de u-PA modificado y HSA.

64. La proteína de fusión de la reivindicación 61 o reivindicación 62, 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.

65. La proteína de fusión de la reivindicación 64, 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.

66. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 38-65 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.

67. La proteína de fusión de la reivindicación 46, que es un dímero mediante interacción de dominios de multimerización complementarios.

68. La proteína de fusión de la reivindicación 67, en donde el dominio de multimerización es un dominio Fc.

69. 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 1-68.

70. Un vector, que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 75.

71. El vector de la reivindicación 70 que es un vector procariota.

72. El vector de la reivindicación 70 que es un vector eucariótico.

73. El vector de la reivindicación 70 que es un vector viral.

74. El vector de la reivindicación 70 que es un vector de levadura.

75. El vector de cualquiera de las reivindicaciones 70-74 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.

76. El vector de cualquiera de las reivindicaciones 70-75 que es un vector de expresión.

77. El vector de cualquiera de las reivindicaciones 70-75 que es un vector de terapia génica.

78. Una célula recombinante aislada o un cultivo celular, que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 69 o el vector de cualquiera de las reivindicaciones 70-77, en donde la célula aislada no es una célula vegetal ni un cigoto humano.

79. Una línea de células no humanas, que comprende la molécula de

ácido nucleico de la reivindicación 69 o el vector de cualquiera de las reivindicaciones 70-77, en donde la línea celular, que no es no es una línea celular vegetal, es de origen mamífero, insecto, levadura o procariota.

80. Una célula recombinante aislada, que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 69 o el vector de cualquiera de las reivindicaciones 70-77, en donde la célula aislada no es una célula vegetal o un cigoto humano.

81. Una combinación, que comprende dos composiciones que incluyen:

(a) un polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-37 o una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 38-68; y

(b) un segundo agente o agentes para inhibir o reducir la activación del complemento.

82. La combinación de la reivindicación 81, en donde el segundo agente o agentes son uno o más agentes antiinflamatorios o anticoagulantes.

83. La combinación de la reivindicación 81 o reivindicación 82, 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.

84. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 81-83, en donde el polipéptido de u-PA modificado comprende la modificación V41R.

85. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 81-84, en donde el polipéptido de u-PA modificado comprende las modificaciones V38E/V41R.

86. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 81-85, en donde el polipéptido de u-PA modificado comprende las modificaciones Y40Q/V41R/L97bA o Y40Q/V41L/L97bA o R37aS/V41R/L97bG/H99Q.

87. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 81-85, en donde el polipéptido de u-PA modificado comprende las modificaciones:

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

88. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 81-87, 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.

89. 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 1-37 o una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 38-68 en una célula;

cultivar la célula bajo condiciones por lo cual se expresa el polipéptido;

y

opcionalmente, aislar el polipéptido expresado.

90. El método de la reivindicación 89, en donde la célula es una célula eucariota.

91. El método de la reivindicación 90, en donde la célula es una célula de mamífero o una célula de levadura.

92. Una composición farmacéutica, que comprende un polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-37 o una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 38-68 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

93. La composición farmacéutica de la reivindicación 92, en donde el polipéptido de u-PA modificado o proteína de fusión está en una forma activada de dos cadenas.

94. La composición farmacéutica de la reivindicación 92 o reivindicación

93, 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.

95. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 92-94, en donde el polipéptido de u-PA modificado o proteína de fusión tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1015 o 1019.



**Superintendencia de
Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2021/0008338
Recibo: 25-142467
Fecha: 07/05/2025

CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO
CC: 66.783.790
Pago PSE No: 1105433
CUS: 1465666126

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	\$ 225,000	\$ 225,000
TOTAL					\$ 225,000



**Superintendencia de
Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2021/0008338
Recibo: 25-142496
Fecha: 07/05/2025

CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO
CC: 66.783.790
Pago PSE No: 1105464
CUS: 1465837046

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	50005-01-01	Solicitud examen de patentabilidad Patente PCT (DESCUENTO INTERNET)	1	\$ 1,522,000	\$ 1,522,000
TOTAL					\$ 1,522,000