

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, domiciliado en Massachussets, Estados Unidos de América, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. 16334 notificado electrónicamente el 25 de septiembre de 2025, relacionado con los requerimientos de fondo de la solicitud, atentamente me permito presentar la siguiente información:

1. Título

Objeción del examinador:

El examinador afirma que el título de la invención "POLIPÉPTIDOS DE ACTIVADOR DE PLASMINÓGENO, TIPO UROCINASA, MODIFICADOS Y MÉTODOS DE USO" no se relaciona con el objeto de la solicitud contenida en las reivindicaciones y la propuesta hecha el 7 de mayo de 2025 en respuesta al oficio pasado, tampoco cumple con dicho requerimiento ya que considera que la referencia al polipéptido debe estar en singular.

Argumento del solicitante:

Para superar la objeción, el solicitante propone modificar el título como se muestra a continuación:

"POLIPÉPTIDOS MODIFICADOS DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO TIPO UROQUINASA (U-PA), COMPOSICIONES QUE CONTIENEN LOS POLIPÉPTIDOS MODIFICADOS Y MÉTODOS PARA SU PREPARACIÓN."

En relación con la reivindicación del Examinador según la cual el título debe redactarse en singular, el Solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con dicha apreciación.

El Solicitante no comparte la opinión de que los polipéptidos y las composiciones deban expresarse en singular. Tanto la descripción como las reivindicaciones no se dirigen a un único polipéptido u-PA modificado, sino que contemplan una pluralidad de polipéptidos u-PA modificados, comprendiendo cientos de variantes, cada una de las cuales se encuentra modificada conforme a lo ejemplificado en la solicitud y según lo reivindicado. Cada uno de dichos polipéptidos u-PA modificados presenta la característica técnica común de poseer especificidad y/o actividad de corte frente a la proteína del complemento C3, tal como se demuestra ampliamente en la memoria descriptiva. Asimismo, la descripción no describe una única composición que comprenda un polipéptido u-PA modificado, sino que divulga múltiples composiciones y proporciona métodos detallados para la preparación y el uso de los polipéptidos u-PA modificados y de las composiciones que los comprenden.

En vista de lo anterior, se solicita respetuosamente al Examinador que reconsidere su apreciación y acepte el título propuesto.

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 cuarenta y cinco (45) reivindicaciones, el cual reemplaza completamente el documento presentado el 7 de mayo de 2025. Específicamente, se realizaron las siguientes modificaciones:

- 2.1 Se modificó la reivindicación 1 con el fin de:
 - 2.1.1 Eliminar la referencia al polipéptido u-PA no modificado y sus secuencias respectivas.
 - 2.1.2 Incluir las secuencias del polipéptido u-PA modificado de conformidad con la Tabla 14 de la descripción.
 - 2.1.3 Eliminar el grupo de modificaciones por numeración de quimotripsina de los polipéptidos modificados.

- 2.2 Se eliminaron las reivindicaciones 2, 3, 7 a 9, 11, 12, 15 a 21, 27, 28, 45, 46, 49 a 51, 57. 59. 60, 63, 64, 76, 77 y 86 a 88. Además, se ajustó la numeración del documento.
- 2.3 Se modificó la antigua reivindicación 5 (nueva reivindicación 2), con el fin de incluir dos grupos de modificaciones. Estas modificaciones se sustentan en
- 2.4 Se modificó la antigua reivindicación 6 (nueva reivindicación 3), con el fin de:
 - 2.4.1 Reclamar que la modalidad del polipéptido u-PA modificado en la que las SEQ ID NO: 21 y 18 y la posición 122 no se modifica. Esta modificación se sustenta en las páginas 9, 18, 19 y ejemplo 8 de la descripción.
 - 2.4.2 Eliminar el grupo de modificaciones reclamados por numeración de quimotripsina.
- 2.5 Se modificó la antigua reivindicación 10 (nueva reivindicación 4), con el fin de:
 - 2.5.1 Reclamar un grupo restringido de secuencias que caracterizan el polipéptido u-PA modificado. Esta modificación se sustenta en la Tabla 14 de la descripción.
 - 2.5.2 Eliminar el grupo de modificaciones reclamados por numeración de quimotripsina.
- 2.6 Se modificó la antigua reivindicación 26 (nueva reivindicación 11) con el fin de reclamar que el polímero comprende un polipéptido seleccionado entre poli-D,L-aminoácidos y la albúmina sérica humana (HSA). Esta modificación se sustenta en las antiguas reivindicaciones 27 y 28 así como en la sección *iv. Compañeros de fusión* de las páginas 160 a 166 y página 113 de la descripción.
- 2.7 Se unificó la materia de las reivindicaciones 30 y 31 en la nueva reivindicación 13.
- 2.8 Se modificó las antiguas reivindicaciones 32 y 33 (nuevas reivindicaciones 14 y 15), con el fin de referirse tanto al polímero como una porción de este. Esta modificación se sustenta en la sección *c. Conjugación a polímeros* de las páginas 113 de la descripción.
- 2.9 Se unifica la materia de las antiguas reivindicaciones 34 a 36 en la nueva reivindicación 16.
- 2.10 Se unificó la materia de las antiguas reivindicaciones 39 y 40 en la nueva reivindicación 19.

- 2.11 Se unificó la materia de las antiguas reivindicaciones 41 y 42 en la nueva reivindicación 20.
- 2.12 Se unificó la materia de las antigua reivindicaciones 43 y 44 en la nueva reivindicación 21. Además, se restringió el grupo del que se selecciona la secuencia señal.
- 2.13 Se modificó las antiguas reivindicaciones 47 y 48 con el fin de reemplazar el término "compañero de fusión" por "polipéptido de no proteasa o la porción del mismo".
- 2.14 Se unificó las antiguas reivindicaciones 54 y 55 en la nueva reivindicación 26.
- 2.15 Se modificó la antigua reivindicación 66 (nueva reivindicación 32) con el fin de caracterizar la cadena A, B y el enlace disulfuro. Esta modificación se sustenta en la página 13 de la descripción.
- 2.16 Se unificó la materia de las antiguas reivindicaciones 70 a 74 en la nueva reivindicación 34.
- 2.17 Se modificó la antigua reivindicación 78 (nueva reivindicación 36) con el fin de aclarar que la célula no es una célula embrionaria.
 - 2.17.1 Se modificó la antigua reivindicación 81 con el fin de:
 - 2.17.2 Reclamar un kit en lugar de una combinación. Esta modificación se sustenta en la página 13 de la descripción.
 - 2.17.3 Eliminar la referencia a que inhibe o reduce el complemento.
 - 2.17.4 Unificar la materia de las antiguas reivindicaciones 82 y 83
- 2.18 Unificar la materia de las antiguas reivindicaciones 84 y 85 en la reivindicación 38. Además, aclarar que la combinación es de del polipéptido u-PA modificado o la proteína de fusión.
- 2.19 Se modificó las antiguas reivindicaciones 78 y 89 (nuevas reivindicaciones 36 y 39) con el fin de aclarar que la célula esta in vitro y no es célula embrionaria. Esta modificación se sustenta en las páginas 15 y 26 de la descripción.
- 2.20 Se eliminó el término "*opcionalmente*" del capítulo reivindicatorio.

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, 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.

4. Excepción de patentabilidad

4.1. El Examinador considera que las reivindicaciones 89–91 están excluidas de la patentabilidad conforme al artículo 20 a) de la Decisión 486, al referirse a un método para producir un polipéptido modificado utilizando una célula no caracterizada en las reivindicaciones. Según la memoria descriptiva, dicha célula puede incluir diversos tipos celulares, incluidas células madre o progenitoras de distintas fuentes, lo que, a criterio del Examinador, abarca células derivadas de embriones humanos.

Con base en principios jurisprudenciales, el Examinador concluye que la materia reivindicada constituye una excepción a la patentabilidad por implicar el uso de material embrionario humano. Asimismo, considera que las reivindicaciones 78–80 también están excluidas, ya que, aunque excluyen al cigoto humano, la memoria descriptiva sigue comprendiendo células madre o progenitoras, incluidas las derivadas de hígado fetal, lo que las sitúa igualmente dentro del ámbito prohibido por razones éticas.

En este sentido, el Solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del Examinador. No obstante, con el fin de dar continuidad al trámite, el Solicitante ha decidido modificar las antiguas reivindicaciones 78 y 89 (actuales reivindicaciones 36 y 39).

En particular, se han modificado dichas reivindicaciones para establecer expresamente que la célula aislada utilizada en el método no es una célula vegetal ni un cigoto

humano, y que no deriva de un feto ni de un embrión, excluyendo de manera inequívoca cualquier posible derivación de células embrionarias.

Esta limitación del alcance de ambas reivindicaciones se introduce con el propósito de evitar cualquier interpretación errónea que pudiera sugerir una afectación a principios éticos, dejando claramente delimitado el objeto de la invención.

Bajo este marco, el alcance de las reivindicaciones debe interpretarse a la luz de la invención en su conjunto. En el presente caso, la manipulación celular está exclusivamente vinculada a un método para producir un polipéptido u-PA modificado destinado a inhibir la activación del complemento. La invención se dirige claramente a usos terapéuticos en patologías tales como lesión por isquemia-reperfusión, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, sepsis, enfermedades autoinmunes, retinopatías diabéticas, degeneración macular asociada a la edad, rechazo de trasplantes y trastornos inflamatorios, sin que exista una interpretación razonable que implique manipulación de embriones en ningún contexto.

Lo anterior es plenamente coherente con lo dispuesto en el artículo 51 de la Decisión 486, según el cual: "El alcance de la protección conferida por la patente estará determinado por el tenor de las reivindicaciones. La descripción y los dibujos, o en su caso, el material biológico depositado, servirán para interpretarlas."

Sin perjuicio de ello, resulta importante enfatizar que, si bien la descripción permite interpretar el alcance de la invención, es el tenor literal de las reivindicaciones el que define el alcance de la protección, el cual no debe extenderse a definiciones adicionales. En este sentido, la solicitud describe diversas modalidades de realización, mientras que el alcance efectivo de implementación de la invención queda determinado exclusivamente por las reivindicaciones, conforme a lo establecido en la Guía de Examen 2023, página 103, según la cual: "Las reivindicaciones definirán la materia que se desea proteger mediante la patente. Deben ser claras y concisas y estar enteramente sustentadas por la descripción."

En virtud de las modificaciones introducidas y de la correcta interpretación del alcance de las reivindicaciones a la luz de la descripción y del marco normativo aplicable, el Solicitante considera que quedan plenamente superadas las objeciones planteadas en relación con consideraciones éticas tanto para las reivindicaciones modificadas como sus reivindicaciones dependientes. En consecuencia, se solicita respetuosamente al

Examinador que tenga por atendidas dichas objeciones y continúe con el examen de fondo de la solicitud.

4.2. El Examinador considera que las reivindicaciones 81-88 no son patentables por estar dirigidas a métodos terapéuticos, los cuales se encuentran excluidos de protección. Dichas reivindicaciones se refieren a la combinación de un polipéptido u-PA modificado con uno o más agentes adicionales definidos por su capacidad de inhibir o reducir la activación del complemento.

Según el Examinador, de acuerdo con la memoria descriptiva, esta materia corresponde a métodos de tratamiento, ya que las composiciones se describen como kits que comprenden una primera composición con el polipéptido u-PA modificado (o proteínas de fusión) y una segunda composición con agentes adicionales para el tratamiento de enfermedades mediadas por el complemento. En consecuencia, al estar directamente relacionadas con su uso terapéutico, dichas reivindicaciones se consideran excluidas de patentabilidad.

En este sentido, el Solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del Examinador. Al respecto, desea destacar que los fármacos que presentan la característica técnica de inhibir o reducir la activación del complemento son ampliamente conocidos en el estado de la técnica, y que la solicitud proporciona una lista extensa y descriptiva de ejemplos representativos de dichos fármacos. En consecuencia, el Solicitante no pretende proteger ni atribuirse la invención de anticoagulantes, antiinflamatorios u otros fármacos similares ya conocidos, sino que ha desarrollado polipéptidos u-PA modificados con capacidad de inhibir la activación del complemento, los cuales pueden utilizarse en combinación con fármacos o terapias adicionales empleadas en el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones mediadas por el complemento.

Si bien esta característica funcional se describe en relación con el kit, dicha funcionalidad no forma parte del alcance de la reivindicación modificada, por lo que la protección solicitada no recae sobre el efecto terapéutico en sí mismo, sino exclusivamente sobre los componentes del kit. Ello no implica desconocer que la inhibición del complemento constituye un efecto técnico relevante de la invención, sino que dicho efecto no es el objeto directo de protección reivindicado.

Con el fin de aportar mayor claridad y en atención a la sugerencia del Examinador, la antigua reivindicación 81 ha sido modificada para recitar expresamente un kit

compuesto por dos composiciones, incorporando en la definición del segundo agente las limitaciones anteriormente establecidas en las reivindicaciones 82 y 83, ahora integradas en la antigua reivindicación 81 (actual reivindicación 37). Esta modificación tiene como finalidad dejar claro que las reivindicaciones no se dirigen a un método de tratamiento, sino a un kit de componentes que, conforme a la descripción de la solicitud, puede ser empaquetado opcionalmente junto con reactivos adicionales, instrucciones de uso, viales u otros recipientes, jeringas y demás artículos necesarios para la utilización de los polipéptidos u-PA modificados.

En virtud de lo anterior, se solicita respetuosamente que la presente objeción sea tenida por superada y se continúe con el examen de fondo de la solicitud.

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 considera que el capítulo reivindicatorio no es conciso, dado que comprende un número excesivo de reivindicaciones y un amplio conjunto de alternativas de polipéptidos con elevada complejidad, lo que impide determinar con claridad el alcance de la materia reclamada. En este sentido, sugiere agrupar las alternativas cuando sea posible, siempre que exista una generalización razonable y que cada alternativa cuente con soporte en la descripción.

En este sentido, el Solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del Examinador. No obstante, con el fin de dar continuidad al trámite, el Solicitante ha modificado el capítulo reivindicatorio, tal como se detalla en la sección 2 del presente memorial de respuesta, ajustando las reivindicaciones dependientes para incorporar las sugerencias relativas a la caracterización estructural del polipéptido u-PA y, al mismo tiempo, hacer el capítulo reivindicatorio más conciso, contribuyendo así a una mayor claridad del alcance de la protección solicitada.

Estas modificaciones se encuentran debidamente sustentadas y desarrolladas en los argumentos que se exponen a continuación. En virtud de lo anterior, y a la luz de las

modificaciones introducidas, se solicita respetuosamente al Examinador que tenga por superada la presente objeción.

5.2 El Examinador considera que la reivindicación 1 no es concisa ni clara, ya que define un gran número de polipéptidos mediante combinaciones de sustituciones sin caracterizarlos por sus características técnicas esenciales, en particular mediante un SEQ ID NO específico. Asimismo, observa inconsistencias entre las SEQ ID NO citadas y los polipéptidos modificados efectivamente descritos, así como la inclusión de variantes con C122C que no se encuentran exploradas ni sustentadas en la solicitud. En consecuencia, estima que la reivindicación abarca polipéptidos especulativos y sugiere limitarla a los polipéptidos modificados efectivamente divulgados, caracterizándolos inequívocamente por su SEQ ID NO.

En este sentido, el Solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del Examinador. La definición de la secuencia polipeptídica u-PA no modificada sobre la cual se introducen las modificaciones reivindicadas permite identificar de manera completa e inequívoca las secuencias de los polipéptidos reivindicados, tal como se ha explicado en memorial de respuesta a oficios anteriores. En efecto, partiendo de la secuencia base, una persona versada en la técnica puede introducir las modificaciones descritas y obtener la estructura polipeptídica modificada sin requerir esfuerzo indebido ni actividad inventiva adicional.

No obstante, con el fin de atender la objeción formulada y dar continuidad al trámite, la reivindicación 1 ha sido modificada para establecer expresamente que los polipéptidos reivindicados comprenden aquellos definidos en los SEQ ID NOs correspondientes, conforme a la sugerencia del Examinador, incorporando así dichas secuencias específicas.

5.3. Adicionalmente, el Examinador considera que las reivindicaciones 2, 3, 7 a 9 y 15 a 17 no son claras, ya que las secuencias mencionadas no caracterizan adecuadamente el polipéptido modificado. Sugiere eliminar dichas reivindicaciones y definir el polipéptido únicamente mediante sus características técnicas esenciales en la reivindicación independiente.

El Solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del Examinador. No obstante, con el fin de contribuir a la continuidad del trámite, y en atención a la sugerencia del Examinador, así como considerando las modificaciones introducidas en

la reivindicación independiente 1, el Solicitante ha decidido eliminar las antiguas reivindicaciones 2, 3, 7 a 9 y 15 a 17.

Por lo tanto, se solicita amablemente que la presente objeción sea considerada superada.

5.4 El Examinador considera que las reivindicaciones 4, 5, 6, 10, 11 y 12 carecen de claridad y concisión, al definir los polipéptidos únicamente mediante combinaciones de sustituciones sin identificar un SEQ ID NO específico, lo que da lugar a un número indeterminado de variantes sin adecuado sustento en la descripción y dificulta la delimitación del alcance de la protección. Asimismo, señala la inclusión injustificada de variantes C122C, cuando las secuencias divulgadas presentan C122S, y observa incoherencias con la reivindicación independiente al introducir secuencias y modificaciones no reflejadas en la reivindicación 1. Adicionalmente, indica que las reivindicaciones 1, 4 y 10 reivindican la misma materia, sugiriendo su unificación y la caracterización inequívoca de los polipéptidos mediante su correspondiente SEQ ID NO, limitando las reivindicaciones a la materia efectivamente descrita.

El solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del Examinador y destaca que el alcance de las reivindicaciones es claro, en cuanto se dirige a polipéptidos u-PA modificados cuyo dominio proteasa incorpora las modificaciones especificadas, permitiendo así escindir la proteína C3. No obstante, con el fin de atender la objeción planteada y dar continuidad al trámite, las reivindicaciones han sido modificadas para suprimir la enumeración de combinaciones de sustituciones y sustituirla por la identificación expresa de los correspondientes SEQ ID NO de los dominios proteasa que contienen dichas modificaciones, tal como fueron descritos en las reivindicaciones anteriores a las presentes modificaciones.

Ahora es relación con la objeción relaciona a la variante sin modificar C122C el solicitante manifiesta su desacuerdo nuevamente con la opinión del examinador. **El solicitante reitera los argumentos expuestos en la última respuesta. Es excesivamente limitante limitar el alcance de las reivindicaciones sobre polipéptidos que contienen solo C122S cuando: (1) C122C es el residuo nativo; y 2) personas versadas en el campo (discutidos más adelante) en el mismo campo artístico usaban (y se les concedieron patentes dirigidas a) polipéptidos que contenían C122 o C122S hace 20+ años.** La intercambiabilidad de C122 por C122S, y viceversa, era rutina hace 20+ años y lo es hoy en día.

Por ende, se resalta que la información divulgada forma parte integral de la invención y debe considerarse suficiente, en la medida en que se sustenta tanto en las modalidades descritas como en el conocimiento general del campo técnico. Ello satisface el requisito de suficiencia conforme a los lineamientos de la Guía de Examen de Patentabilidad 2023, página 124, sección 4.4.2 (Suficiencia), según la cual: *"La descripción debe contener información técnica suficiente para que la persona medianamente versada en la materia pueda poner en práctica (o reproducir) la invención, sin necesidad de realizar un esfuerzo inventivo que exceda sus habilidades ordinarias. En consecuencia, solo se configuraría una falta de suficiencia cuando la información necesaria para ejecutar la invención se omite y no puede ser suplida por el conocimiento general de dicha persona."*

En consecuencia, se entiende que todos los polipéptidos u-PA modificados pueden incluir el C122S o pueden ser C122 (usados indistintamente con C122C) mediante numeración de quimotripsina. La cisteína en la posición 122 según la numeración de quimotripsina es el aminoácido silvestre u-PA no modificado; C122 es el aminoácido natural presente en u-PA que puede formar un enlace disulfuro entre Cys148 (numeración de quimotripsina C97a) y Cys279 (C122) para formar una forma de dos cadenas en u-PA silvestre; véase, *por ejemplo*, página 76, líneas 5-14, que reclama:

"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)." (énfasis añadido)

C122, o C122C (utilizados indistintamente), corresponde al residuo aminoacídico nativo según la numeración de quimotripsina en MTSP-1. Este residuo es bien conocido en el arte, ya que C122 es una cisteína libre que puede sustituirse opcionalmente por el aminoácido conservador serina (S) con el fin de reducir o eliminar la agregación proteica, particularmente en ensayos in vitro. Dicha sustitución tiene un carácter opcional y experimental, dado que C122 constituye el residuo de tipo silvestre presente de forma natural y no representa, en sí mismo, una modificación estructural.

El solicitante enfatiza que la sustitución de la C122 natural por C122S es **opcional y no influye en la actividad de la proteasa**. Esto se enseña en la solicitud inmediata, y es reconocido desde hace mucho tiempo en el arte de las proteasas serina. C122 es una cisteína libre que, en experimentos *in vitro*, da lugar a la agregación de proteínas.

Las proteínas de fusión, como las que se enumeran en la Tabla 7 del Ejemplo 14, contienen polipéptidos u-PA modificados que componen C122C, contienen el polipéptido u-PA modificado que no incluye C122S. Como se describe en la solicitud (véase, *por ejemplo*, el último párrafo del Ejemplo 1), C122 puede servir como sitio para la conjugación de una mitad de PEGilación u otra modificación. Cuando se expresa *in vivo*, la agregación generalmente no es un problema. Para la que la forma activa es una forma de dos cadenas unida por un enlace disulfuro, el Cys libre en el residuo 122 generalmente no se modifica a Ser para que esté disponible para formar el enlace disulfuro.

Se detalla a lo largo de la solicitud que los polipéptidos modificados de u-PA pueden contener el reemplazo de C122S o no contener el reemplazo de C122S. El reemplazo de C122S es *opcional* y, como se describe en la solicitud, se incluye para eliminar la agregación, especialmente en experimentos *in vitro* en los que C122C es una cisteína libre que forma enlaces con la cisteína libre en otras moléculas. Sustituir la cisteína libre en el residuo 122 por serina no afecta ni altera la actividad enzimática, incluida la escisión de C3. El reemplazo de C122S, según se detalla en la solicitud, se incluye para reducir la agregación de los polipéptidos, especialmente *in vitro* cuando la U-PA es una forma de cadena única; aunque ventajoso, es opcional. Véase, por ejemplo, la descripción en la página 5, líneas 5-15, que dice:

"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, línea 11, que recita (énfasis añadido):

*"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 polipéptidos u-PA modificados que no incluyen el reemplazo de C122S también puede encontrarse en la página 207-208 que reclaman(énfasis añadido):

*"Los polipéptidos incluyen el reemplazo C122S para evitar la agregación tras la expresión, por ejemplo, del dominio de proteasa. En algunas modalidades, el polipéptido de u-PA modificado es de longitud completa que se activa para formar un polipéptido activado de dos cadenas. Para estas modalidades, **el dominio de proteasa de u-PA modificado no incluye el reemplazo C122S** (279 por numeración madura); la cisteína forma un enlace disulfuro (entre 148C y 279C por numeración madura, con referencia a SEQ ID NO:3)"*

La descripción de polipéptidos de u-PA modificados que no incluyen el reemplazo de C122S también puede encontrarse en las páginas 154, líneas 12-17, que detallan modificaciones ejemplares de polipéptidos de u-PA, y recitan (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."

C122S no afecta la actividad de los polipéptidos. Es bien sabido en el arte que el residuo C122 es una cisteína libre en el dominio de la proteasa de serinas, incluyendo, por ejemplo, u-PA y MTSP-1, y que el residuo C122 puede ser reemplazado por S para eliminar la agregación. El dominio proteasa de la familia de polipéptidos MTSP fue clonado y descrito en una familia de aplicaciones y patentes, y en todos los dominios proteasas también se prepararon C122S. Por ejemplo, véase el párrafo (24) de la patente estadounidense nº 7,700,341, que forma parte de una familia de patentes y solicitudes, con prioridad desde 2000 y anteriores, titulada "Nucleic Acid Molecules Encoding Transmembrane Serine Proteases, The Encoded Proteins And Methods Based on It", para Madison y demás., que dice:

"(24) También se proporcionan muteínas de los dominios de la proteasa de cadena simple y los MTSP, particularmente muteínas en las que el residuo de Cys en el dominio proteasa que es 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 conservadora de aminoácidos o una subestación [sic] eso no elimina la actividad y las muteínas en las que se elimina un sitio o sitios de glicosilación. Muteínas en las que también se contemplan otras sustituciones conservadoras de aminoácidos en las que se mantiene la actividad catalítica (véase, por ejemplo, la Tabla 1, para sustituciones ejemplares de aminoácidos). Véase también la FIG. 4, que identifica los residuos libres de Cys en MTSP3, MTSP4 y MTSP6."

Esta familia de solicitudes y patentes muestra y reclama los dominios proteasas de las proteasas serina, por ejemplo, MTSP-1 y u-PA, y muestra que el dominio proteasa con y sin C122S sigue siendo proteínas catalíticamente activas como cadenas individuales. Esta familia describe la sustitución de C122 por S para eliminar la cisteína libre. Así, las proteasas serina con y sin la modificación en C122 eran bien conocidas en el arte durante más de 15 años antes de la fecha de prioridad más temprana reclamada.

La solicitud describe que el polipéptido u-PA modificado puede contener el reemplazo de C122S o no contener un reemplazo en la posición 122; El reemplazo se incluye especialmente para reducir o eliminar la agregación *In vitro* y es opcional. La solicitud indica en todo el proceso, incluido el texto que acompaña las tablas, que el reemplazo del C122S es opcional. La solicitud también describe que C122S está incluido en los

polipéptidos de cadena simple probados para evitar la agregación *In vitro* y no afecta a la especificidad o actividad del sustrato.

La persona versada en la materia entendería que la modificación C122S es opcional y podría obtener los polipéptidos u-PA modificados con C122C, que es el residuo natural de aminoácidos y donde S es una modificación conservadora de C. La modificación de C122 para C122S era conocida en el arte mucho antes de la fecha de prioridad más temprana reclamada de la solicitud en este caso. Está perfectamente dentro de la capacidad de la persona experta obtener los polipéptidos u-PA modificados con C122C o C122S siguiendo las enseñanzas de la solicitud. No se requiere experimentación.

Teniendo en cuenta los argumentos y modificaciones presentados amablemente se solicita al examinador considerar superada a la presente objeción.

5.5. El examinador considera que la reivindicación 12 es poco clara porque es inconsistente con la reivindicación independiente 1. La reivindicación 12 introduce la SEQ ID NO: 555 con modificaciones específicas, pero dicha secuencia no está reflejada en la reivindicación 1. El examinador también objeta la expresión que permite variantes C122C, ya que las secuencias en cuestión contienen C122S, lo que produce polipéptidos no respaldados.

En este sentido, el solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo. No obstante, con el único propósito de dar continuidad al trámite, el solicitante resalta que la reivindicación 12 ya no hace parte del capítulo reivindicatorio; en consecuencia, la objeción relacionada con esta queda superada.

5.6. El Examinador considera que la reivindicación 13 no es clara, ya que menciona una SEQ ID NO que no se encuentra incluida en la reivindicación independiente. Sugiere realizar las correcciones necesarias para garantizar coherencia interna.

En este sentido, el solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del Examinador, dado que la SEQ ID NO: 987 corresponde a la misma secuencia que la SEQ ID NO: 21, con la única diferencia de que el residuo en la posición C122 es una cisteína. La reivindicación 1 enmendada, de la cual depende la reivindicación 13, recita expresamente la SEQ ID NO: 21 o las mismas secuencias excepto que el residuo en la posición C122 es C. En consecuencia, la reivindicación 13 queda plenamente comprendida dentro del alcance de la reivindicación 1, incluyendo la SEQ ID NO: 987, y no resulta incompatible con el fundamento en el que se basa la objeción planteada. Por lo tanto, a la luz de esta modificación es posible considerar superada la presente objeción.

- 5.7.** El Examinador considera que las reivindicaciones 18-21, 22 y 25 no son claras, puesto que se refieren únicamente a resultados a alcanzar sin caracterizar técnicamente el polipéptido reivindicado. Sugiere su eliminación.

En este sentido el solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo, ya que las antiguas reivindicaciones 18-21 y 25 describen condiciones o características inherentes a los polipéptidos u-PA modificados reclamados por separado. No obstante, con el único fin de dar continuidad al proceso se eliminaron las antiguas reivindicaciones 18-21 y 25. En ese sentido es posible considerar superada la presente objeción.

- 5.8.** El Examinador considera que la reivindicación 26 no es clara, ya que no distingue ni define adecuadamente el polipéptido ni el polímero al que se refiere. Sugiere eliminarla.

El solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del Examinador. No obstante, la reivindicación 26 ha sido modificada para enumerar polímeros ejemplares que incrementan la vida media o reducen la inmunogenicidad en suero, a fin de clarificar que la materia reivindicada se dirige a polipéptidos u-PA modificados que incorporan una modificación polimérica capaz de alterar sus propiedades farmacodinámicas. En este contexto, la reivindicación 11 se limita a un polipéptido seleccionado entre poli-D,L-aminoácidos y albúmina sérica humana (HSA), en plena conformidad con lo descrito en la solicitud. En consecuencia, se solicita amablemente dar por superada la presente objeción.

- 5.9.** El Examinador considera que las reivindicaciones 27 a 37 no son claras, dado que únicamente describen resultados a alcanzar y la posibilidad de enlace a otras moléculas, sin caracterizar el polipéptido. Sugiere su eliminación.

Nuevamente, el solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del Examinador. Los polipéptidos u-PA modificados no se limitan a asociarse funcionalmente con otras moléculas, sino que se encuentran ligados o conjugados estructuralmente a dichas moléculas, por ejemplo, mediante un enlace peptídico, con el fin de modificar las propiedades farmacodinámicas del polipéptido u-PA. La u-PA modificada conserva su capacidad de escindir la proteína C3 (véanse los Ejemplos 14-

16), mientras que la molécula ligada o conjugada confiere un aumento de la vida media sérica y/o facilita la direccionalidad hacia tejidos o marcadores celulares específicos.

Las moléculas enlazadas o conjugadas se encuentran claramente caracterizadas y descritas en la memoria descriptiva. En particular, la descripción establece que los compañeros de fusión incluyen, entre otros, aquellos capaces de multimerizar, de aumentar la vida media sérica o de modificar las propiedades de unión del polipéptido. En consecuencia, dichas características constituyen rasgos técnicos estructurales de los polipéptidos reivindicados, y no meros resultados funcionales.

El solicitante reitera los argumentos previamente expuestos y destaca, adicionalmente, que la solicitud proporciona datos experimentales que demuestran la actividad farmacocinética de las proteínas de fusión u-PA modificadas (Ejemplo 15), así como protocolos detallados para la clonación, expresión y preparación de dichas proteínas de fusión (Ejemplo 16). Como se detalla en la solicitud, los polipéptidos u-PA modificados pueden incluir además modificaciones postraduccionales y otras modificaciones en la u-PA, distintas de la secuencia primaria de aminoácidos, como la conjugación o enlace con otros polipéptidos y grupos que alteran propiedades, como la vida media sérica y la resistencia a la proteasa endógena. Estas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, el enlace con albúmina, el enlace con dominios de multimerización y PEGilación; Como se explica en la solicitud y a continuación, **tales modificaciones son bien conocidas en el arte y son modificaciones rutinarias realizadas por personas expertas en el arte de las terapias proteicas**. Por ejemplo, la PEGilación y la multimerización se emplean rutinariamente para aumentar la vida media sérica de proteínas terapéuticas, y varias de las formas comerciales de los polipéptidos incluyen modificaciones como PEGilación y conjugación a un dominio de multimerización.

El solicitante sostiene que, en vista del conocimiento de la persona cualificada y las enseñanzas y ejemplificación de la solicitud, **está perfectamente dentro de la capacidad de alguien experto en el arte modificar los polipéptidos u-PA modificados alegados implementando métodos conocidos que incluyan modificaciones conocidas de terapias proteicas**. Cualquiera de los polipéptidos modificados de u-PA puede modificarse para incluir modificaciones estructurales conocidas y modificaciones postraduccionales, véase, por ejemplo, página 112, línea 14 a páginas 107-108 que reclaman:

"Los polipéptidos de u-PA modificados incluyen aquellos que contienen modificaciones químicas o postraduccionales. En algunos ejemplos, los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente no contienen modificaciones químicas o postraduccionales. Las modificaciones químicas y

postraduccionales incluyen, pero no se limitan a, pegilación, sialación, albuminación, glicosilación, farnisilación, carboxilación, hidroxilación, PASilación, HESilación, fosforilación, unión a uno o más dominios de multimerización, tal como Fc, y otras modificaciones de polipéptidos conocidas en la técnica. Además de una o más modificaciones de aminoácidos, tal como reemplazos, inserciones, deleciones de aminoácidos y combinaciones de los mismos, proporcionados en la presente, los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente se pueden conjugar o fusionar con cualquier porción usando cualquier método conocido en la técnica, incluidos métodos químicos y recombinantes, proporcionando el polipéptido resultante, cuando se encuentra en forma activa, conserva la capacidad de efectuar la escisión inhibitoria o de inactivación de la proteína C3 de complemento.

Por ejemplo, además de una o más modificaciones de aminoácidos, tal como reemplazos de aminoácidos, proporcionados en la presente, los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente también pueden contener otras modificaciones 108 5 10 15 20 25 30 35 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; modificaciones ejemplares aquellas que disminuyen la inmunogenicidad (Sección a; página 108), Dominios Fc (Sección b; páginas 108-112), Conjugación a Polímeros (Sección c, páginas 112-115) y Dominios de Transducción de Proteínas (Sección d; páginas 115-119), e incluyen PEGilación (Sección a; páginas 151-154) y proteínas de fusión (Sección b, páginas 154-170), como proteínas de fusión que contienen fusión con Fc (subsección (a), páginas 161-163), fusión con albúmina sérica humana (HSA) (subsección (b), páginas 163-164), fusión con un anticuerpo variable de fragmento de cadena única (scFv), como scFv que une el colágeno II (C2scFv) (subsección (c), página 165), fusión con HABD (subsección (d) página 165) y fusión con otros polipéptidos. Como otro ejemplo, la solicitud describe polipéptidos de fusión que contienen partes Fc y multímeros formados a partir de ellos. La formación de multiméricos de polipéptidos con partes Fc es bien conocida en el arte, y los dominios Fc modificados también lo son en el arte, tal como se indica en la solicitud.

La solicitud proporciona ejemplos prácticos de la preparación de diversas proteínas de fusión y modificaciones de la secuencia primaria de los polipéptidos u-PA

modificados, y su uso (véanse los Ejemplos 14-16). El Ejemplo 14 ejemplifica la clonación, expresión y preparación de proteínas de fusión u-PA-Albúmina Sérica Humana (HSA), y el Ejemplo 15 ejemplifica su farmacocinética tras la inyección intravítrea. El Ejemplo 16 ejemplifica la preparación, administración, actividad, expresión y otras propiedades de varias proteínas de fusión (o quiméricas). La Sección 1 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, secuencias y expresión de diversas proteínas de fusión. La Sección D describe la activación de las proteínas de fusión:

"D. Estrategias de activación de la proteína de fusión

Se emplearon varias estrategias para la activación de u-PA. Las proteínas expuestas en SEQ ID nos: 1004-1005, 1011 y 1015 se activaron mediante plasmina, como se detalló anteriormente en el Ejemplo 14. Las proteínas expuestas en SEQ ID nos: Se esperaba 5 que 1010, 1014 y 1016 se activaran mediante furina intracelular durante la expresión. La proteína expuesta en SEQ ID NO: Se previó que 1006-1008 se activaría automáticamente durante la expresión. Las proteínas expuestas en SEQ ID nos: 1017 y 1018 se activaron mediante tratamiento DE SUMO proteasa. Para activar las construcciones SUMO-u-PA, habitualmente se adicionaron 10 Unidades de SUMO proteasa por 1 mg de proteína y se dejó 10 incubar durante la noche a 4°C. La purificación adicional en una columna de quelación de níquel HisTrap eliminaría eficazmente el resto DE SUMO marcado con HisTrap.

SEQ ID NO:	Secuencia de activación	Estrategia de activación
1004	peso uPA con Cys	Tratamiento con plasmina
1005	uPA de longitud completa con Cys	Tratamiento con plasmina
1006	Sin secuencia de activación	La escisión de la señal de secreción durante la expresión genera proteasa activada
1007	Sin secuencia de 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 de C3	Secuencia C3 autoactivada después de la expresión
1010	Furina uPA sin Cys	Activación de furina durante la expresión; no es necesaria la activación durante el procesamiento posterior
1011	uPA TS de longitud completa con Cys	Tratamiento con plasmina
1012	Sin secuencia de activación	La escisión de la señal de secreción durante la expresión genera proteasa activada
1013	Sin secuencia de activación	La escisión de la señal de secreción durante la expresión genera proteasa activada
1014	Furina con Cys	Activación intracelular por Furina durante la expresión; activación no necesaria durante el procesamiento subsecuente
1015	uPA con Cys	Tratamiento con plasmina
1016	Furina sin Cys	Activación intracelular por Furina durante la expresión; activación no necesaria durante el procesamiento subsecuente
1017	SUMO	Tratamiento con proteasas SUMO
1018	SUMO	Tratamiento con proteasas SUMO

La Sección E describe la actividad de varias proteínas de fusión y muestra que están activadas *in vivo* y activas. Las secciones F y G describían la preparación de proteínas de fusión y su purificación. La Sección H detalla la construcción de proteínas de fusión, empleando especialmente porciones catalíticamente activas de los polipéptidos u-PA modificados, señales de secreción, compañeros de fusión, secuencias de activación, enlaces y otros compañeros de fusión. Véase, *por ejemplo*, las Tablas 6-9. La Sección I

detalla ensayos para evaluar las actividades de las proteínas de fusión y las proteínas modificadas. Por ende, considerando los argumentos aquí dados amablemente se solicita dar por superada la objeción.

5.10. El Examinador considera que las reivindicaciones 38 a 68 y no son claras y carecen de sustento, ya que definen proteínas de fusión de manera genérica sin caracterizarlas por sus SEQ ID NO ni por los SEQ ID NO de sus componentes, pese a que la descripción divulga únicamente proteínas de fusión específicas. Además, observa que se reivindican combinaciones de elementos (ligadores, dominios, secuencias señal, etc.) que no se encuentran exploradas ni descritas. Sugiere limitar las reivindicaciones a las proteínas de fusión efectivamente divulgadas, caracterizándolas mediante sus SEQ ID NO.

El solicitante discrepa respetuosamente y solicita la reconsideración del rechazo. El solicitante no ha inventado la modificación de polipéptidos con polímeros ni la formación de proteínas de fusión; El solicitante ha inventado polipéptidos u-PA modificados, que contienen las modificaciones de aminoácidos que comprenden los SEQ ID NOs listados en la reivindicación 1 que aumentan la actividad y/o especificidad para la escisión de la proteína del complemento C3. La descripción proporciona **datos ejemplares** para proteínas de fusión que comprenden el SEQ ID NO 21 y el SEQ ID NO 987. La actividad de escisión para TODOS los polipéptidos u-PA modificados mencionados en la reivindicación 1 se caracteriza y respalda en la descripción, véase, por ejemplo, la Tabla 14. Las personas versadas en el campo están muy familiarizadas con los polímeros y compañeros de conjugación que pueden incluirse en una construcción de proteínas de fusión. Los efectos de su conjugación o fusión se comprenden bien en el arte. Las proteínas de fusión que comprenden los polipéptidos u-PA modificados de SEQ ID NOs:21 o 987 muestran resultados ejemplares; estas proteínas de fusión pueden sustituirse por cualquiera de las U-PA modificadas mencionadas en la reivindicación 1 para lograr resultados predecibles, que incluyen que la U-PA modificada conserve su actividad de escisión para C3.

Las personas versadas en el campo también están familiarizadas con los distintos tipos y longitudes de enlaces que se pueden seleccionar y utilizar. Los efectos de la longitud, estructura y composición del ligador se comprenden bien en el arte. La solicitud proporciona **proteínas de fusión ejemplares** que comprenden enlaces y demuestra que los u-PA modificados mantienen la escisión de C3 cuando se conectan a una proteína de fusión mediante un enlace. Los enlazadores están ampliamente descritos y soportados en la descripción. La descripción describe el uso de enlaces peptídicos en

proteínas de fusión e incluye descripción de enlazadores ejemplares, partes de enlace, sus efectos establecidos, e incluye varios ejemplos previos de uso de enlazadores, véase, por ejemplo, página 159, línea 26-página 166, línea 26:

"Los ligadores peptídicos se pueden incluir en proteínas de fusión de u-PA. En un ejemplo, los ligadores peptídicos se pueden fusionar al extremo C-terminal de un primer polipéptido y el extremo N-terminal de un segundo polipéptido. Esta estructura se puede repetir múltiples veces de modo que al menos uno, y opcionalmente 2, 3, 4 o más polipéptidos se enlacen entre sí mediante ligadores peptídicos en sus respectivos extremos. Por ejemplo, una proteína de fusión puede incluir una secuencia X-Y-Z, donde X es el dominio catalítico de u-PA modificado o tipo silvestre, Y es un ligador peptídico y Z es todo o parte del compañero de fusión (por ejemplo, HSA, Fc, HABD o C2 scFv). En algunos casos, X es todo de un u-PA modificado que incluye el extremo N-terminal de u-PA y el dominio de proteasa de u-PA. En otros casos, X es parte de un u-PA modificado que incluye los 12 aminoácidos directamente anteriores del u-PA de dominio de proteasa y el u-PA de dominio de proteasa. En otro ejemplo, el polipéptido puede incluir la secuencia A-X-Y-Z, donde "A" es otro compañero de fusión, tal como un polipéptido, tal como SUMO o HIS-SUMO, que facilita la expresión y/o aislamiento del polipéptido resultante.

Los ligadores peptídicos en general incluyen Gly, Ser y combinaciones de los mismos, o Ala y Prolina. Los ligadores en general contienen de dos a 20 o 25 residuos. Ejemplos de ligadores peptídicos incluyen, pero no se limitan a: __Gly-Gly__, GSG, AGS (SEQ ID NO: 1003), GGGGS (SEQ ID NO:1001), GGSSGG (SEQ ID NO:1002), SSSSG (SEQ ID NO:1024), GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO:1025), GGSTSGSGKSSEGGK (SEQ ID NO: 1026), GSTSGSGKSSSEGGSGSTKG (SEQ ID NO: 1027), GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 1028), EGKSSGSGSESKF (SEQ ID NO: 1029), o AlaAlaProAla o (AlaAlaProAla)_n (SEQ ID NO:1030), donde n es 1 a 6, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Las porciones de unión se describen, por ejemplo, en Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 85:5879-5883, Whitlow et al. (1993) Protein Engineering 6:989-995, y Newton et al., (1996) Biochemistry 35:545-553. Otros ligadores peptídicos adecuados incluyen cualquiera de aquellos descritos en las Patente de Estados Unidos No. 4,751,180 o 4,935,233. Un polinucleótido que codifica para un ligador peptídico deseado se puede insertar entre, y en el mismo marco de lectura que un polinucleótido que codifica todo o parte de un u-PA que incluye el u-PA de dominio de proteasa, usando cualquier técnica convencional adecuada. En un ejemplo, la proteína de fusión contiene un polipéptido de u-PA, por

ejemplo, un dominio de proteasa de u-PA y un compañero de fusión, tal como HSA, Fc, HABD o C2 scFv, separado por uno o más ligadores peptídicos.”

Las proteínas de fusión de las reivindicaciones 38-68 están completamente definidas. Las partes componentes están completamente definidas y/o especificadas por el SEQ ID NO. Cada una de las partes componentes puede seleccionarse según los límites definidos por las reivindicaciones y según lo respalde la descripción. Está perfectamente dentro de la habilidad de la persona versada en el campo realizar partes componentes seleccionadas que produzcan resultados predecibles, que incluyen la característica técnica requerida de aumentar la actividad de escisión para la proteína C3 del complemento. El dominio proteasa de la u-PA modificada se define por SEQ ID NO, los compañeros de fusión son moléculas o partes bien definidas. La reivindicación 42 (renumerada como 20) define los sitios de activación de furina por SEQ ID NO, la reivindicación 55 (renumerada como reivindicación 26) define la secuencia de activación por SEQ ID NO, y la reivindicación 58 (renumerada como reivindicación 28) define la proteína de fusión ensamblada por SEQ ID NO. Proteínas de fusión ejemplares identificadas por SEQ ID NO se demuestran en la descripción como poseyendo la característica técnica unificadora de la actividad de escisión para C3. Estas proteínas de fusión también sirven como prueba de concepto de que las proteínas de fusión u-PA modificadas mantienen la característica técnica de la actividad de corte para C3. En ese sentido amablemente se solicita dar por superada la objeción.

5.11. El Examinador considera que la reivindicación 93 no es clara, ya que la expresión “forma activada de dos cadenas” no se encuentra definida ni resulta comprensible. Sugiere su eliminación.

En este sentido, el solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del Examinador. Es bien conocido en el arte que las proteasas de serina, como la u-PA, se sintetizan inicialmente como zimógenos y posteriormente se activan mediante escisión proteolítica para generar formas activadas de dos cadenas. Este conocimiento general no solo es ampliamente aceptado, sino que además se describe de manera detallada en la presente solicitud.

La solicitud expone extensamente las distintas formas estructurales del polipéptido u-PA modificado, incluyendo el precursor, las formas maduras, los zimógenos de cadena única y las formas activadas. Así, un polipéptido u-PA modificado puede presentarse, según se detalla en la descripción y conforme al conocimiento de la persona versada en la materia, como una proteína de cadena única de longitud completa, susceptible de

procesamiento para generar un polipéptido maduro activado por escisión, dando lugar a dos cadenas unidas mediante enlaces disulfuro entre residuos de cisteína.

Asimismo, las proteínas de fusión descritas en la solicitud pueden procesarse para formar estructuras de dos cadenas, ya sea por escisión proteolítica o mediante la interacción de cisteínas libres presentes en los polipéptidos, tal como se detalla expresamente en la memoria descriptiva.

El procesamiento a dos cadenas ocurre *in vivo* tras la administración de una única cadena madura de la enzima. Cualquier proteína de fusión será procesada *in vivo* en función de señales de procesamiento (como se ejemplifica), que incluyen las introducidas en la proteína de fusión, y aquellas como el sitio de escisión de activación (VVGG) en la forma madura del polipéptido u-PA. Las personas versadas en el campo comprenden la biología de las proteasas serina, que se producen como zimógenos de cadena simple y se procesan mediante una escisión, específica, en formas catalíticamente activas en dos cadenas, donde las cadenas están unidas por enlaces de cisteína. La expresión "*forma activada de dos cadenas*", utilizada en la reivindicación 93, se refiere a una forma activa del polipéptido maduro u-PA. Página 72, de la descripción describe posibles formas de los polipéptidos u-PA modificados, y dice (énfasis añadido):

*"En algunas modalidades, el polipéptido de u-PA modificado es un dominio de proteasa o una forma de cadena individual; en esos casos, la cisteína libre (posición de residuo 122 por numeración de quimotripsina) se reemplaza con una serina, para disminuir o eliminar la agregación luego de la preparación de la proteína. En modalidades en las que el polipéptido u-PA modificado es de longitud completa u otra forma en la que se activa por escisión, el residuo en la posición 122 (por numeración de quimotripsina) en general no se reemplaza con S de modo que el enlace de disulfuro se pueda formar **para producir el polipéptido activado de dos cadenas.**"*

La forma de dos cadenas de los polipéptidos u-PA se describe detalladamente en una sección completa sobre "*estructura*" que comienza en la página 78, línea 27 de la descripción. Por ejemplo, las páginas 75 y 76, describe el procesamiento de un pro-péptido en una forma activada de dos cadenas de la siguiente manera (énfasis añadido):

"De esta manera, luego del transporte al ER y de la eliminación del péptido de señal, se produce un polipéptido de prouroquinasa de 411 aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:3. Como se describe con más detalle más adelante, la prouroquinasa es un zimógeno o proenzima que se procesa adicionalmente mediante escisión proteolítica para generar un

*polipéptido de u-PA maduro de dos cadenas. De esta manera, por ejemplo, con referencia a u-PA maduro (SEQ ID NO:3), el u-PA activado de cadena tipo silvestre contiene una primera cadena (cadena A), residuos 1-158 unidos por disulfuro a los residuos 159-411 (cadena B) a través de un enlace de disulfuro entre Cys148 (numeración de quimotripsina C97a) y Cys279 (numeración de quimotripsina C122). Por lo tanto, en los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente, cuando se produce el dominio proteasa, contiene el reemplazo C122S, pero cuando se **produce una forma activada que es una forma de 2 cadenas**, el residuo en 122 (numeración de quimotripsina) es C de modo que forma un enlace de disulfuro con otro C, en general en la secuencia de activación (ver análisis posterior y Ejemplo 15). "*

Así, el polipéptido u-PA modificado puede ser un dominio proteasa o estar en forma de cadena única o activarse por escisión y formar una forma de dos cadenas. De ese modo, se solicita amablemente dar por superada la presente objeción.

5.12. El Examinador considera que la reivindicación 95 no es clara ni está sustentada, dado que atribuye SEQ ID NO correspondientes a proteínas de fusión a polipéptidos u-PA modificados. Sugiere eliminar dicha atribución incorrecta.

El solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo. Los SEQ ID NO: 1015 y 1019 corresponden a proteínas de fusión que comprenden un polipéptido u-PA modificado. No obstante, con el fin de aportar mayor claridad y evitar cualquier ambigüedad interpretativa, la reivindicación 95 ha sido modificada (actual reivindicación 45) para recitar explícitamente: *"la proteína de fusión que comprende un polipéptido u-PA modificado según lo establecido en el SEQ ID NO: 1015 o 1019"*. En consecuencia, se solicita amablemente al examinador considerar superada la presente objeción.

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.

Objeción del examinador:

El Examinador considera que la solicitud no proporciona una descripción suficientemente completa para el alcance extremadamente amplio de los polipéptidos u-PA modificados y de las proteínas de fusión reivindicadas. En su opinión, una persona experta en la materia no podría reproducir la totalidad del alcance de las reivindicaciones sin recurrir a una experimentación indebida.

El Examinador sostiene que las reivindicaciones abarcan un universo muy amplio de moléculas, que incluye polipéptidos u-PA modificados en numerosos residuos, variantes derivadas de cualquiera de las secuencias u-PA no modificadas de las SEQ ID NO: 1-6 o de porciones que contienen el dominio de proteasa, variantes en las que el residuo C122 permanece sin modificar, formas poliméricas y PEGiladas, así como proteínas de fusión con múltiples tipos de ligadores, diversos compañeros de fusión, dominios de multimerización, dominios de transducción proteica, secuencias señal y secuencias de activación, además de composiciones que comprenden cualquiera de los anteriores y secuencias específicas como las SEQ ID NO: 1015 y 1019.

No obstante, el Examinador señala que el soporte experimental se limita a polipéptidos u-PA modificados concretos, identificados por un conjunto específico de SEQ ID NO, y que, en el caso de las proteínas de fusión, únicamente aquellas correspondientes a las SEQ ID NO: 1004-1018 y 1036-1039 cuentan con sustento experimental, utilizando exclusivamente las SEQ ID NO: 21 o 987 como componente u-PA. En particular, destaca que no se aporta evidencia experimental para proteínas de fusión como la SEQ ID NO: 1019.

El Examinador añade que la memoria descriptiva se limita a listar proteínas de fusión y sus componentes, sin demostrar la implementación de todas las combinaciones estructurales reivindicadas, por lo que cada proteína debería estar caracterizada de manera inequívoca mediante su SEQ ID NO. En consecuencia, concluye que la descripción resulta insuficiente para sustentar y habilitar la preparación de la totalidad del amplio conjunto de polipéptidos, variantes, formas PEGiladas, proteínas de fusión y composiciones reivindicadas.

Argumentos de solicitante:

El solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del Examinador. Las reivindicaciones definen de manera completa los polipéptidos, y todas las combinaciones de modificaciones contempladas en ellas se encuentran probadas en la solicitud, demostrando que dan lugar a polipéptidos capaces de escindir C3. El Examinador no puede desconocer las múltiples realizaciones estructuralmente sustentadas que se divulgan en la descripción, toda vez que el artículo 51 de la Decisión 486 no limita la patentabilidad únicamente a las realizaciones expresamente ejemplificadas, sino que comprende todo el alcance estructural debidamente apoyado por la divulgación. En este sentido, la solicitud proporciona cientos de ejemplos funcionales que evidencian el efecto técnico de modificaciones individuales y de combinaciones de modificaciones.

A la vista de los cientos de ejemplos, la persona versada en el campo sabe qué modificaciones de aminoácidos, incluidas sustituciones, inserciones y deleciones, aumentan la actividad y/o la especificidad del C3, y cuáles no. Así mismo, la persona versada en la materia sabe cómo modificaciones como los compañeros de fusión, los enlaces para los compañeros de fusión, la PEGilación y otras modificaciones afectan a la estabilidad y/o entrega de las proteínas. En la solicitud se demuestran modificaciones ejemplares y proteínas de fusión que muestran que la actividad y/o especificidad de la escisión para C3 se mantiene en diversas formas de proteínas de fusión. Por tanto, no es necesario que alguien experto en el arte explore experimentalmente cada secuencia o modificación posible descrita en la solicitud. **No** requeriría una carga excesiva de prueba y error para que alguien experto en el arte produjera **cualquier** u-PA modificado que abarcan las reclamaciones. Alguien con experiencia en el arte podría utilizar fácilmente la información proporcionada en la descripción para producir una u-PA modificada dentro de los límites de las reivindicaciones y, así, producir una u-PA modificada que tenga la característica técnica de aumentar la actividad y/o especificidad para la escisión de la proteína C3 del complemento.

Incluir cada posible polipéptido como una secuencia separada y probar cada permutación de polipéptido requeriría miles de secuencias y experimentos respectivos, para definir lo que ya está definido por las reivindicaciones y lo que ya ha sido demostrado por los Ejemplos proporcionados en la descripción.

Esta situación es análoga a la de una reivindicación química que define una fórmula general y enumera distintos sustituyentes con alternativas posibles, sin que resulte necesario ni razonable listar cada permutación como una estructura independiente. De igual manera, las reivindicaciones actuales definen la estructura general de los polipéptidos y enumeran las modificaciones posibles, quedando las secuencias plenamente caracterizadas.

En efecto, las reivindicaciones, tal como han sido modificadas, definen de manera explícita el dominio proteasa modificado de u-PA, es decir, la porción de la proteína responsable de la actividad de escisión de C3, mediante su correspondiente SEQ ID NO. Las reivindicaciones dependientes, por su parte, contemplan modificaciones adicionales que pueden seleccionarse en función del uso o del efecto técnico deseado, por ejemplo, para mejorar la solubilidad o la estabilidad de las u-PA modificadas definidas en la reivindicación 1.

Adicionalmente, como se ha señalado previamente, no es exigible la prueba experimental de todas las modalidades para cumplir con el requisito de suficiencia. Tal como establece la Guía de Examen de Patentabilidad 2023 (pág. 124), basta con uno o un número razonable de ejemplos que permitan a la persona normalmente versada en la materia, en combinación con sus conocimientos generales, reproducir la invención en todo el ámbito reivindicado sin necesidad de un esfuerzo inventivo. En consecuencia, la ausencia de ejemplos específicos para cada alternativa reivindicada no afecta la suficiencia, siempre que dichas alternativas se encuentren debidamente descritas, como ocurre en el presente caso.

En vista de las observaciones y enmiendas aquí presentadas y del artículo 51 de la Decisión 486, que no restringe la patentabilidad a incorporaciones que no hayan sido explícitamente probadas, el solicitante solicita respetuosamente la reconsideración del rechazo.

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

7. Unidad de Invención

Objeción del examinador:

El Examinador considera que la solicitud no cumple con el requisito de unidad de invención, dado que el concepto común de la materia reivindicada, un polipéptido activador del plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA) modificado, ya fue divulgado previamente en los documentos US20060142195A1 (D1) y Tsuji et al.

En este contexto, el Examinador identifica la existencia de 259 grupos inventivos distintos que, a su juicio, están siendo reivindicados, correspondientes cada uno a una secuencia específica de u-PA modificado. Asimismo, precisa que el examen de fondo se realizará únicamente respecto del primer grupo inventivo.

Argumentos del solicitante:

El solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del examinador. Todos los polipéptidos reclamados comprenden las modificaciones V41R, y todos se muestran en la solicitud para escindir C3. Así, todos los polipéptidos comparten una característica técnica común. Las referencias citadas no proporcionan ni sugieren esta característica técnica ni sus elementos.

El documento US2006/0142195 A1 (D1) se analiza en detalle más adelante, mientras que Tsuji et al. resulta completamente irrelevante para la materia reivindicada. D1 se centra exclusivamente en mejorar la actividad nativa de la u-PA como activador del plasminógeno. Por su parte, Tsuji et al.¹ introduce mutaciones en u-PA con el único propósito de estudiar las interacciones específicas entre la u-PA y su receptor nativo.

Ninguna de estas referencias sugiere, ni mucho menos divulga, modificaciones destinadas a alterar las actividades nativas de la u-PA para permitir el reconocimiento y la escisión de un sustrato no nativo como la proteína del complemento C3, ni para inhibir la activación del complemento. Tampoco existe en dichas referencias indicación alguna que motive a modificar la u-PA con fines distintos a los nativos, ni se identifican residuos relevantes para alcanzar tales efectos técnicos. En particular, no se menciona ni se sugiere la sustitución V41R, ni su impacto en la capacidad de la u-PA para escindir C3.

Las reivindicaciones actuales son unificadas en que los polipéptidos u-PA modificados, tal como se afirman, comparten la característica técnica de que tienen una mayor especificidad y actividad para la escisión de la proteína del complemento en la tierra C3 carecen de actividad nativa de activadores de plasminógeno. Las variantes u-PA mencionadas comprenden todas la modificación V41R, que no está enseñada ni sugerida por ninguna de las normas anteriores. Como se muestra y se discute en las secciones siguientes, la modificación V41R incrementa la actividad de escisión en C3 de 25 a 27 veces. Se muestra que todos los polipéptidos mencionados en las reivindicaciones cortan C3. Los efectos de la modificación V41R y de las otras

¹ Tsuji, S. et al. (2011), The effects of amino acid mutations on specific interactions between urokinase-type plasminogen activator and its receptor: ab initio molecular orbital calculations, Journal of Molecular Graphics and Modelling, 29(8): 975–984; PMID: 21605990

modificaciones mencionadas que permiten el cambio de sustratos no se enseñan ni se sugieren en ninguna de los documentos anteriores. Los polipéptidos reclamados no tienen actividad activadora de plasminógeno, y la u-PA de tipo silvestre no divide C3. Véase, por ejemplo, la Tabla 16, que muestra prácticamente ninguna tasa de rotación de u-PA de tipo silvestre para la división de C3. Véase también la tabla 19, que muestra que no hay actividad para la división C3:

Tabla 19: Inhibición de C3 en plasma humano		
Numeración de la quimotripsina	SEQ ID NO.*	ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)
U-PA de tipo silvestre (dominio proteasa) con C122S	5	> 6000

La especificidad y actividad de sustrato de los polipéptidos reivindicados se ha modificado de manera que reconocen y escinden la proteína del complemento C3, en lugar de su sustrato nativo, el plasminógeno. Tal como se demuestra en el Ejemplo 12 y en la Tabla 24, los polipéptidos diseñados para la escisión de C3 no activan el plasminógeno, confirmando el cambio funcional deliberado de especificidad.

Todos los polipéptidos reivindicados, así como los descritos en la solicitud, comparten esta característica técnica esencial común: la capacidad de escindir C3. En todos los casos, dichos polipéptidos fueron seleccionados e identificados específicamente por su reconocimiento del sitio de escisión en C3. La solicitud demuestra expresamente que el polipéptido u-PA no modificado no reconoce dicho sitio; de hecho, la u-PA de tipo silvestre, incluso cuando incorpora la sustitución C122S, introducida únicamente para evitar la agregación mediada por enlaces disulfuro a través del residuo libre C122— no escinde C3. En consecuencia, los polipéptidos reivindicados no actúan como activadores de plasminógeno, sino como proteasas con especificidad hacia C3.

Asimismo, la solicitud demuestra que los polipéptidos reivindicados comparten características estructurales y funcionales comunes. Todos se basan en los mismos andamios estructurales definidos por los SEQ ID NOs: 1–6 (secuencias u-PA no modificadas) o por porciones de estas que comprenden los dominios proteasa definidos en los SEQ ID NOs: 2 y 5. Todas las modificaciones introducidas se localizan en el dominio proteasa y están destinadas a alterar la especificidad de sustrato para permitir el reconocimiento del sitio de corte en C3. En coherencia con ello, las reivindicaciones actualmente enmendadas hacen referencia expresa a los SEQ ID NOs de los dominios proteasa modificados.

Los polipéptidos u-PA de la presente solicitud se modifican para tener actividad y especificidad para cortar la proteína del complemento C3, que inactiva C3. En particular, los polipéptidos u-PA presentan un reconocimiento alterado del sustrato, de modo que tienen un reconocimiento reducido o nulo del plasminógeno nativo del sustrato. En contraste, como se describe a continuación, D1 se dirige a usos y modificaciones de u-PA relacionadas con la modificación de u-PA para que corte su sustrato nativo y sea una u-PA mejorada, y Tsuji modifica u-PA para investigar sus interacciones nativas de unión a receptores. Ni D1 ni Tsuji sugieren eliminar su actividad nativa. La característica técnica común compartida entre los polipéptidos reclamados es un polipéptido u-PA modificado con actividad y/o especificidad para la división de C3; Los polipéptidos reclamados no pueden usarse para tratar el ictus isquémico disolviendo coágulos.

Los polipéptidos u-PA modificados mencionados en las reivindicaciones requieren que compartan la modificación V41R, lo que se muestra en la solicitud como un aumento de la especificidad y/o actividad para C3 (véase el Ejemplo 13, discutido más adelante)., Ejemplo 13, Tabla 23 (reproducido más abajo), cuantifica la escisión de la proteína de complemento del sustrato C3 para el polipéptido u-PA no modificado (SEQ ID NO:5) y para los polipéptidos modificados de u-PA SEQ ID NOs:21-33, con el fin de identificar los efectos técnicos de cada uno de R35Q, H37Y, R37aE, V38E, T39Y, V41R, D10aP, Y60bQ, T97aI, L97bA, H99Q, y Y149R. El ejemplo 13 demuestra específicamente que V41R incrementa la actividad intrínseca del anti-C3 y la actividad anti-C3 en el 80% del plasma humano en aproximadamente 25 - 27 veces. Todos los polipéptidos reclamados comprenden V41R y escinden C3.

En la solicitud se presentan datos correspondientes a polipéptidos que incorporan la sustitución V41R, en combinación con modificaciones adicionales, coherentes con los polipéptidos u-PA modificados definidos en las reivindicaciones enmendadas (algunos de estos datos se reproducen a continuación). Dichos polipéptidos modificados escinden C3 y no escinden plasminógeno, que es el sustrato nativo de la u-PA. La solicitud proporciona evidencia experimental que demuestra que estos polipéptidos modificados presentan una reducción sustancial o ausencia de actividad de escisión sobre el plasminógeno. En contraste, los datos muestran que la u-PA de tipo silvestre, o la u-PA que únicamente incorpora la sustitución C122, no escinde C3 y sí escinde plasminógeno. En consecuencia, una característica técnica unificadora del conjunto de reivindicaciones enmendadas es la provisión de polipéptidos u-PA modificados que incorporan la sustitución V41R y presentan actividad de escisión específica sobre C3. Como se describe a continuación, la solicitud describe las modificaciones de aminoácidos en u-PA y sus efectos sobre la escisión de C3. Por ejemplo, V41R incrementa la actividad intrínseca

de la escisión C3 y la actividad de la escisión C3 en el 80% del plasma humano aproximadamente 25-27 veces.

Los polipéptidos con modificaciones adicionales, según se afirma, tienen actividad de escisión para C3 y, como se detalla aquí, todos fueron identificados mediante un ensayo que captura polipéptidos que reconocen el sitio de escisión en C3. D1, que se discute en detalle a continuación y en la respuesta anterior, no revela, enseña ni sugiere un polipéptido u-PA modificado que comprenda la modificación V41R que parte e inactiva C3, ni ninguna de las modificaciones o combinaciones de modificaciones que se parezcan o sugieran las u-PA modificadas incluidas en las reivindicaciones.

El efecto técnico de los polipéptidos u-PA modificados que comprenden la modificación de aminoácidos V41R para introducir actividad y/o especificidad del polipéptido u-PA para la escisión de C3 se demuestra a lo largo de la solicitud con cientos de ejemplares funcionales (900 ejemplares funcionales). Véase, página 4, líneas 10-23 de la solicitud, que reclama (énfasis añadido):

*"Los polipéptidos de u-PA modificados inactivan la proteína C3 de complemento por escisión. Los polipéptidos de u-PA modificados escinden C3 para inhibir de esta manera la activación del complemento, escinden C3 en un sitio, tal como en el sitio activo, que inactiva o inhibe la actividad de C3 para inhibir así la activación del complemento. Los polipéptidos de u-PA modificados proporcionados en la presente **se seleccionaron y diseñaron para escindirse dentro de QHARASHLG**, y en particular donde P1-P1' es RA (QHAR\ASHL; ver SEQ ID NO:47 residuos 737-744, donde la escisión se encuentra entre los residuos 740 y 741). Como resultado, estos polipéptidos de u-PA modificados se pueden utilizar como productos terapéuticos para tratar trastornos, enfermedades y/o condiciones en las que la activación del complemento juega un papel tal que la inhibición de los mismos puede tratar los trastornos, enfermedades y/o condiciones. Los polipéptidos de u-PA modificados también pueden tener actividad reducida para un sustrato natural, tal como plasminógeno, en comparación con un u-PA tipo silvestre o en comparación con uno que solo tiene el reemplazo correspondiente a C122S, por numeración de quimotripsina."*

Todos los polipéptidos u-PA modificados fueron modificados y seleccionados para escindir C3; el polipéptido u-PA silvestre no lo hace. La solicitud proporciona casi 900 polipéptidos que cortan C3 y proporciona combinaciones de mutaciones para efectuar dicha actividad. En la página 6, líneas 2-5, la solicitud dice:

"En particular, entre estos polipéptidos de activador de plasminógeno, tipo uroquinasa (uPA), modificados se encuentran aquellos que contienen una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas de entre reemplazos correspondientes a R35Q, H37Y, V41R, V41L, Y40Q, D60aP, L97bA, T97aI y H99Q."

El ejemplo 13 analiza los efectos de cada una de estas modificaciones. Como se muestra en el Ejemplo 13, cada uno de los reemplazos tiene los siguientes efectos:

- R35Q incrementa la actividad intrínseca anti-C3 (es decir, en el tampón) aproximadamente 2,7 veces y aproximadamente 4,3 veces en presencia de un 80% de plasma humano;
- H37Y incrementa la actividad anti-C3 aproximadamente 2,4-2,5 veces en el tampón y en presencia de un 80% de plasma humano;
- R37aE disminuye la actividad anti-C3 en relación con el residuo de tipo silvestre aproximadamente 3,2 veces; pero en presencia de un 80% de plasma humano, no tuvo efecto sobre la actividad anti-C3, aunque también contribuye a una mayor estabilidad del polipéptido (véase Tabla 17 y Tabla 23);
- V38E mejora la estabilidad de la proteína en el humor tampón y vítreo y aumenta la actividad anti-C3 en el 80% del plasma humano en ~1,5 veces;
- T39Y incrementa la actividad intrínseca anti-C3 y la actividad anti-C3 en el 80% del plasma humano en aproximadamente 7,5-8,5 veces;
- V41R incrementa la actividad intrínseca anti-C3 y la actividad anti-C3 en el 80% del plasma humano en aproximadamente 25 - 27 veces;
- D60aP incrementa la actividad intrínseca anti-C3 y la actividad anti-C3 en el 80% del plasma humano en aproximadamente 1,2 a 1,6 veces;
- Y60bQ disminuye la actividad intrínseca anti-C3 aproximadamente 1,7 veces y disminuye la estabilidad de la proteína en vítreo tras la incubación durante 7 días a 37 °C en ~1,4 veces; pero en presencia de un 80% de plasma humano, aumenta la actividad anti-C3 aproximadamente 1,1 veces;
- T97aI incrementa la actividad intrínseca anti-C3 y la actividad anti-C3 en presencia del 80% de plasma humano en aproximadamente 1,2 - 1,3 veces;
- L97bA incrementa la actividad anti-C3 aproximadamente 6,4 - 8,2 veces en el tampón y en el 80% del plasma humano;
- H99Q incrementa la actividad anti-C3 aproximadamente entre 2,9 y 4,8 veces en tampón y en un 80% de plasma humano; y
- Y149R disminuye la actividad anti-C3 aproximadamente entre 1,6 y 2,1 veces en el tampón y en un 80% en plasma humano.

También se dirige la atención a la discusión que sigue a continuación, que proporciona datos adicionales de la solicitud. Los polipéptidos u-PA modificados tienen actividad y/o especificidad para C3, y actividad o especificidad reducida o nula para la escisión de una secuencia de sustrato en plasminógeno. La característica técnica común compartida entre todos los polipéptidos es un polipéptido u-PA modificado que comprende V41R y parte e inactiva C3. El polipéptido u-PA de tipo silvestre y los polipéptidos u-PA modificados de Tsuji y D1 no conforman V41R y no pueden cortar e inactivar C3.

Como se describe en la solicitud, todos los polipéptidos fueron identificados mediante un ensayo que selecciona polipéptidos que escinden un sitio objetivo en C3. El ensayo, objeto de patentes anteriores de propiedad común, selecciona polipéptidos que reconocen el objetivo y son capturados covalentemente por polipéptidos de trampa de proteasas (es decir, serpines modificados) al reconocer el sitio objetivo presentado por los polipéptidos trampa de proteasas, que luego se une covalentemente al polipéptido atrapado, que es identificado. Así, cada polipéptido seleccionado reconoce el sitio objetivo de C3 (residuos 737-745 de C3; SEQ ID N° 47). La Tabla 14 muestra la actividad de unos 1000 polipéptidos modificados y proporciona polipéptidos ejemplares que comprenden las modificaciones. Los datos de la Tabla 14 se obtuvieron in vitro utilizando los dominios proteasas de los polipéptidos u-PA que comprenden las cadenas de mutación recitadas. Para uso in vivo, se pueden usar formas precursoras y otras formas de los polipéptidos u-PA modificados porque se activan in vivo, como se detalla en la solicitud.

La reivindicación 1 y las reivindicaciones dependientes requieren que el polipéptido modificado comprenda secuencias de residuos de aminoácidos establecidas en las secuencias recitadas; se ha demostrado que los polipéptidos que comprenden cada uno de los SEQ ID NO recitados escinden C3 (véase los datos correspondientes en la Tabla 14). Las reivindicaciones no abarcan un polipéptido u-PA modificado que no escinde C3. Todos los polipéptidos fueron seleccionados para reconocer y cortar el sitio objetivo, los residuos 737-745 de C3.

Todos los polipéptidos u-PA modificados mencionados de la reivindicación 1 comprenden la modificación V41R. Las reivindicaciones dependientes mencionan modificaciones adicionales, que mejoran o mantienen la actividad modificada de u-PAs y/o la especificidad para la escisión de C3. La persona experta en el arte, al leer la solicitud, podría identificar un polipéptido u-PA modificado que comprende V41R y que tenga actividad y/o especificidad para la escisión de C3 en comparación con un polipéptido u-PA no modificado. Está dentro de la capacidad de la persona experta evaluar si un polipéptido modificado tiene actividad y/o especificidad alterada en comparación con un polipéptido no modificado. A la vista de los cientos de ejemplos de modificaciones y cadenas de modificación que dan lugar a dicho polipéptido, la persona experta podría

identificar modificaciones adicionales, como las que se enumeran en las reivindicaciones dependientes y ejemplificadas en la solicitud, que resultan en un polipéptido u-PA modificado con actividad y/o especificidad para la escisión de C3.

La reivindicación 1 abarca polipéptidos u-PA modificados que comprenden las SEQ ID NO reivindicadas. Todos ellos comparten la característica técnica común de escindir C3, característica que no está presente en la u-PA de tipo silvestre. Además, la solicitud presenta datos experimentales para polipéptidos que contienen las SEQ ID NO recitadas (Tabla 14), demostrando que cada uno de los polipéptidos evaluados exhibe actividad de escisión sobre C3. Todos estos polipéptidos incorporan la sustitución V41R.

Los polipéptidos u-PA modificados actualmente reivindicados escinden C3, mientras que el polipéptido u-PA silvestre no presenta dicha actividad. La consideración conjunta de todos los ejemplos y datos experimentales proporcionados para los polipéptidos u-PA modificados, algunos de los cuales se reproducen más adelante, demuestra que los reemplazos definidos en la reivindicación independiente 1 y en las reivindicaciones dependientes aumentan la actividad y/o la especificidad hacia la proteína C3 del sistema del complemento. Véanse, por ejemplo, los efectos de los reemplazos individuales descritos en el Ejemplo 13 (páginas 259–261), reproducidos anteriormente.

Las reivindicaciones actuales requieren la modificación V41R; como se muestra en el ejemplo 13, esta modificación incrementa la actividad intrínseca anti-C3 y **la actividad anti-C3 en el 80% del plasma humano en aproximadamente 25 - 27 veces.** La u-PA no modificada (por ejemplo, polipéptidos que comprenden el dominio proteasa establecido en el SEQ ID NO:5) no escinde C3; los datos muestran que la u-PA puede modificarse, incluso con la modificación V41R, para que corte C3 en comparación con la u-PA tipo silvestre. Los ejemplos muestran que los polipéptidos modificados no escinden plasminógeno ni lo hacen con al menos 100 veces menos actividad que la u-PA no modificada. Los datos también muestran una reducción o eliminación en la capacidad de escindir el plasminógeno, el sustrato nativo. La solicitud contiene datos para más de 300 polipéptidos u-PA modificados ejemplares, cada uno con un EC50 inferior a 100 nM para la división de C3, y cada uno contiene modificación V41R. Esto incluye todo lo que se menciona en la reivindicación 1. La solicitud, por tanto, demuestra que u-PA que comprende la modificación V41R, y las modificaciones tal como se describen en las reivindicaciones dependientes, escinde C3.

Se evaluaron cientos de polipéptidos u-PA modificados más por su actividad de escisión, incluyendo casi 1000 ejemplares funcionales, incluyendo u-PA tipo silvestre, sin escisión

de hC3 (véase, por ejemplo, la Tabla 14, que proporciona datos para más de 950 polipéptidos). Como se muestra en la solicitud, u-PA tiene sustancialmente ninguna actividad para C3 (véanse las tablas 19 y 20). La dosis ED₅₀ (dosis efectiva en condiciones fisiológicas) de polipéptidos u-PA de tipo silvestre y modificados es la necesaria para cortar el 50% del C3 en el plasma anticoagulado "de prueba". Los polipéptidos u-PA modificados con las modificaciones listadas en la Tabla 14 se comparan con el dominio de la proteasa u-PA silvestre no modificado con la modificación C122S. La modificación C122S se introduce para prevenir la agregación de proteínas y no afecta a la actividad de la u-PA. Los estudios en los Ejemplos de Trabajo comparan los polipéptidos u-PA modificados con el tipo silvestre u-PA.

La ED₅₀ (media dosis máxima efectiva (ED₅₀) se refiere a la concentración de u-PA que produce una pérdida del 50% de C3) medida en las Tablas 14 y 19, reproducidas a continuación, es *in vitro*; la actividad de la proteasa u-PA que contiene el reemplazo de C122S (SEQ ID NO:5) refleja el hecho de que la u-PA no alterada no divide C3 ni tiene especificidad para la escisión de C3.

El Ejemplo 7 muestra la selectividad de los polipéptidos u-PA modificados, que incluyen la modificación V41R, para la escisión de C3 en comparación con la u-PA no modificada (véase , por ejemplo, la Tabla 20). Los resultados de la Tabla 20, reproducidos a continuación, muestran que los polipéptidos u-PA modificados tienen una actividad enzimática significativamente disminuida para el plasminógeno del sustrato. Todos los polipéptidos u-PA modificados probados mostraron una disminución de ED₅₀ y una disminución de kcat/Km en comparación con el dominio de la proteasa u-PA de tipo silvestre con el reemplazo de C122S establecido en la SEQ ID NO 5.

Los polipéptidos u-PA modificados presentados en las tablas que se reproducen a continuación, tomadas de la solicitud, muestran actividad reducida o nula frente al plasminógeno, que es el sustrato nativo de u-PA. En contraste, todos exhiben aumentos múltiples en la especificidad y en la actividad de escisión sobre C3, así como una mayor capacidad para inhibir la activación del sistema del complemento, en comparación con la u-PA no modificada. La mayoría de los polipéptidos u-PA modificados evaluados escinden la proteína del complemento humano C3 de forma significativamente más eficiente que el dominio proteasa de u-PA silvestre que incorpora el reemplazo C122S, mostrando incrementos de eficiencia superiores a 1000 veces, reflejados en valores de ED₅₀ sustancialmente más bajos. En particular, muchos de estos polipéptidos presentan valores de ED₅₀ inferiores a 100 nM. A continuación, se reproducen resultados representativos correspondientes a polipéptidos u-PA modificados que comprenden la

sustitución V41R (indicada en negrita), con ED₅₀ inferior a 100 nM, extraídos de las Tablas 14, 19 y 20 de la solicitud.

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M ⁻¹ s ⁻¹)
5	U-PA de tipo silvestre (dominio proteasa) con C122S	N/A (>3500)	> 6000	1.54E+04
8	F30Y/V38D/Y40H/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/M157K	35.7	1028	4.03E+02
9	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/ V41R /Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	29.8	257	<1.0E+01
10	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	5.33	195	
11	R35W/R36H/H37N/V38E/T39F/Y40F/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192H	22.8	208	
12	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	10.8	227	<1.0E+01
13	F30Y/R35W/R36H/H37N/V38E/T39Y/Y40F/ V41R /Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	15.7	220	
14	F30Y/R35W/R36H/H37P/V38E/T39Y/Y40F/ V41R /Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	10.6	185	
17	F30Y/R35Y/R36H/H37P/R37aQ/V38E/T39Y/Y40F/ V41R /Y60bH/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K		173	<1.0E+01

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- 1s-1)
18	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/ V41R /D60 aT/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149 R	19.5	253	<1.0E+01
19	R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/ V41R /D60 aP/Y60bL/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149 R	8.13	318	
20	R35W/H37D/R37aP/V38E/T39W/ V41R /Y6 0bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	16.6	196	<1.0E+01
21	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/ V41R /D60 aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149 R	24.5		
22	H37Y/R37aE/V38E/T39Y/ V41R /D60aP/Y60 bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	51.1		
23	R35Q/R37aE/V38E/T39Y/ V41R /D60aP/Y60 bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	46.1		
24	R35Q/H37Y/V38E/T39Y/ V41R /D60aP/Y60 bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	10.7		
25	R35Q/H37Y/R37aE/T39Y/ V41R /D60aP/Y60 bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	56.2		
28	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/ V41R /Y60b Q/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	29.8		
29	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/ V41R /D60 aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	10.6		
30	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/ V41R /D60 aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	25.3		
32	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/ V41R /D60 aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/C122S/Y149R	92.3		
33	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/ V41R /D60 aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	9.27		
42	T39Y/ V41R /L97bA/H99Q/C122S	49		
43	T39Y/ V41R /Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S	33.2		

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- 1s-1)
44	T39Y/ V41R /D60aP/L97bA/H99Q/C122S	58.2		
171	F30H/V38D/ V41R /L97bA/H99Q/Y151L/M157K	30.6		
171	F30H/V38D/ V41R /L97bA/H99Q/Y151L/M157K	42.8		
176	F30H/V38D/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/Y149N/Y151L/M157K	60.3		
184	F30H/V38D/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K/R217D	54		
198	I17V/F30Y/V38D/Y40H/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/M157K	66		
199	F30Y/V38D/Y40H/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/Y149W/M157K	71.3		
216	I17V/F30Y/R35Q/H37W/V38D/Y40H/ V41R /Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K	58.6		
217	F30Y/R35Q/H37W/V38D/Y40H/ V41R /Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K/T158A	18.3		
218	I17V/F30Y/R35Q/H37W/V38D/Y40H/ V41R /Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K/T158A	12		
219	I17V/F30Y/V38D/Y40H/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A	21.6		
221	F30Y/R35Q/R36H/H37W/V38E/Y40H/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	18.6		
222	I17V/F30Y/R36H/V38E/Y40H/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	19.6		
223	I17V/F30Y/R35Q/R36H/H37W/V38E/Y40H/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	9.65		

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- 1s-1)
224	F30Y/R36H/V38E/Y40H/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A	12.9		
225	I17V/F30Y/R35Q/R36H/H37W/V38E/Y40H/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A	5.21		
226	F30Y/R36H/V38E/Y40H/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	59.9		
227	I17V/F30Y/V38D/Y40H/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	94.8		
228	F30Y/R35Q/H37W/V38D/Y40H/ V41R /Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	88.8		
230	F30Y/R36H/V38E/Y40H/ V41R /K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	27.9		
231	F30Y/R36H/R37aH/V38E/Y40H/ V41R /K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	31.9		
232	F30Y/R36H/V38E/Y40H/ V41R /K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	58		
233	F30Y/R36H/R37aH/V38E/Y40H/ V41R /K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	70.3		
240	F30Y/R35Q/H37Y/V38D/Y40H/ V41R /Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	98.7		
242	F30Y/R36H/V38E/Y40H/ V41R /I65T/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	33.6		
243	F30Y/R36H/V38E/Y40L/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	83.5		
249	F30Y/R36H/V38E/Y40H/ V41R /I65T/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	54.1		
260	I17V/F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/ V41R /Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	11.9		

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- 1s-1)
261	F30Y/R35W/R36Q/H37E/V38A/T39W/Y40H/ V41R /Y60bQ/K61D/I65V/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	28.4		
262	F30Y/R35W/R36Q/H37E/V38E/T39W/Y40H/ V41R /Y60bQ/K61L/I65V/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	24.4		
263	F30Y/R35W/R36A/H37E/V38E/T39W/Y40H/ V41R /Y60bQ/K61D/I65R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	18.4		
264	F30Y/R35W/R36K/H37E/V38E/T39W/Y40H/ V41R /Y60bQ/K61E/I65T/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	17.9		
265	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39Y/Y40F/ V41R /Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	23.8		
270	F30Y/R36H/V38E/Y40H/ V41R /T97aE/L97bA/H99Q/C122S/M157K	59.3		
271	R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	19.9		
272	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	4.68		
273	F30Y/R36H/V38E/Y40H/ V41R /T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	35.7		
275	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/Y149R/M157K	6.24		
275	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/Y149R/M157K	13.7		
276	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/ V41R /K61R/K62R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	3.51		

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- 1s-1)
277	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/ V41R /K82R/T97aI/L97bA/H99Q/K110aR/C 122S/Y149R/M157K	2.47		
278	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/ V41R /K92R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y1 49R/M157K	3.04		
279	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/ V41R /K92S/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y1 49R/M157K	3.48		
280	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M 157K/K179R	2.49		
281	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M 157K/K179S	3.87		
282	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M 157K/K187S/K223S/K224Y	34.9		
283	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/ V41R /Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/ M157K	8.6		
284	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/ V41R /Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S	8.78		
285	F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/ V41R /Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	8.44		
286	F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/ V41R /Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/M157K	6.38		
287	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/ V41R /K61S/K62S/T97aI/L97bA/H99Q/C12 2S/Y149R/M157K	4.75		

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- 1s-1)
288	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/ V41R /K82S/T97aI/L97bA/H99Q/K110aS/C 122S/Y149R/M157K	5.82		
289	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M 157K/K187R/K223R/K224R	18.9		
290	F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/ V41R /Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S	8.23		
291	R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/ V41R /D60 aP/Y60bL/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	4.38		
292	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40F/ V41R /Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y 149R/M157K	20.7		
299	R35Q/H37Y/R37aE/V38D/T39Y/ V41R /D60 aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149 R	77.3		
300	R35Q/H37Y/V38E/T39Y/ V41R /D60aP/T97a I/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	14.7		
311	T39L/Y40L/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C12 2S	23.7		
312	V38D/Y40L/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C12 2S	80.7		
313	V38D/T39L/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C12 2S	66.3		
315	V38D/T39L/Y40L/ V41R /L97bA/H99Q/C122 S	79		
324	H37G/G37bD/V38F/T39H/ V41R /Y60bK/T9 7aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q1 92T/R217E/K224R	32.1		

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- 1s-1)
325	H37G/R37aD/V38F/T39H/ V41R /Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	47.9		
326	H37G/R37aD/G37bD/T39H/ V41R /Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	49		
329	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/ V41R /T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	58.5		
330	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/ V41R /Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	44.6		
335	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/ V41R /Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/R217E/K224R	11.5		
337	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/ V41R /Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E	56.4		
338	H37G/R37aD/V38F/T39H/ V41R /Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	26.7		
339	H37G/R37aD/V38F/T39H/ V41R /Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E	34.8		
340	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/ V41R /Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E	34.5		
341	H37G/R37aD/V38F/T39H/ V41R /Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E	26.8		
369	V41R /L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217V	25.1		

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- 1s-1)
370	V38D/ V41R /H99Q/C122S/Y151L/R217V	29.1		
371	V38D/ V41R /L97bR/C122S/Y151L/R217V	54.3		
382	V41R /H99Q/C122S/Y151L/R217V	16		
398	T39Y/ V41R /D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S	31.4		
399	T39Y/ V41R /L97bG/H99Q/C122S	36.8		
400	T39H/ V41R /L97bG/H99Q/C122S	78.4		
401	T39W/ V41R /L97bG/H99Q/C122S	29.7		
402	T39Y/ V41R /Y60bQ/L97bG/H99Q/C122S	31.1		
403	T39Y/ V41R /Y60bP/L97bA/H99Q/C122S	42.1		
404	T39Y/ V41R /Y60bP/L97bG/H99Q/C122S	39.2		
417	V38D/ V41R /A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/R217D	68.8		
436	V38D/ V41R /A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L/Q192E/R217D	56.3		
446	R36H/V38D/Y40F/ V41R /D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L/Q192E/R217D	42.2		
466	R36H/G37cD/V38D/ V41R /A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/M157T/R217D	75		
469	R36H/V38D/ V41R /A96D/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/T178S/R217D	17.5		
475	F30H/V38D/Y40F/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157F	42.5		
481	F30H/V38D/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157S	43.8		
484	F30H/V38D/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	28.1		
485	F30Y/V38D/Y40H/ V41R /L97bA/H99Q/C122S	99.9		

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- 1s-1)
486	F30H/V38D/ V41R /A96G/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	23.7		
487	F30H/G37bD/V38D/T39H/ V41R /L97bA/H99Q/R110dH/C122S/Y151L/M157K/S240I	55.5		
494	F30Y/R35H/V38D/Y40H/ V41R /T56A/L97bA/H99Q/C122S/M157K	28.5		
495	F30Y/V38D/Y40H/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A	33.5		
496	F30Y/V38E/Y40H/ V41R /T56A/L97bA/H99Q/C122S/M157K/K243M	31.9		
498	F30Y/R36H/V38E/Y40H/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	40.5		
500	F30Y/R35H/V38D/T39S/Y40L/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/T147S/M157K	84.7		
503	F30H/R36L/V38E/ V41R /K82R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	29		
504	F30H/R35H/V38D/ V41R /K61E/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K/R206H	35.4		
505	I17V/F30H/V38D/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	22.2		
506	F30H/R35S/V38E/ V41R /Y60bH/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	50.1		
507	F30H/R36H/V38D/ V41R /T56A/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	40		
508	F30H/R35Q/H37T/V38D/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/Y149I/Y151L/M157K/R217D	93.6		
509	F30H/R35Q/H37W/V38D/ V41R /D60aE/Y60bS/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/Y151L/M157K	40.8		

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- 1s-1)
510	F30H/R35Q/H37Q/V38D/ V41R /A96D/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/Y151L/M157K/R217D	96.8		
511	F30H/R35H/H37I/V38D/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/Y149W/Y151L/M157K/R217S	30.6		
513	F30H/R35Q/H37W/V38D/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	14.7		
514	F30H/R35L/H37D/V38D/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K/R217E	21.8		
515	F30H/R35Q/H37T/V38D/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	28.9		
516	F30H/R35Q/V38D/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	32		
517	F30H/R35Q/H37W/V38D/ V41R /D60aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/Y151L/M157K/R217D	36.4		
518	F30H/R35Q/V38D/ V41R /Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149N/Y151L/M157K	66.3		
519	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/Y149W/M157K/R217D	58.8		
520	F30Y/R35Q/H37W/V38D/Y40H/ V41R /Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K	78.3		
523	F30Y/R35H/V38D/Y40H/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/M157K	87.3		
535	F30H/V38D/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157T	52.9		
542	N26D/F30Y/V38D/Y40H/ V41R /I65T/L97bA/H99Q/C122S/M126I/M157K	93.2		
543	F30Y/V38D/Y40L/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K/Q192H	42.4		

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- 1s-1)
545	F30Y/V38D/Y40L/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157A/Q192Y	51.5		
550	F30Y/R36H/V38D/Y40H/ V41R /L97bA/H99L/C122S/F141L/M157K/T158A	38.5		
551	F30Y/R35H/V38D/Y40H/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/I138V/M157K	33.1		
552	T22I/F30Y/R35S/V38D/Y40H/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/I138V/M157K	42.9		
553	F30Y/R36S/V38D/T39I/Y40H/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/S146P/M157K/T158S	54.6		
555	F30Y/R35L/V38D/Y40H/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/M157K	65.1		
557	F30Y/R35L/V38D/Y40H/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A	11.3		
561	F30Y/R35L/V38D/Y40H/ V41R /N76S/L97bA/H99Q/C122S/M157K/K187E	43.6		
562	F30Y/R35H/V38D/Y40H/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158S	26.3		
564	F30H/V38D/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K/Q192H/R239H	85.7		
565	F30H/R35Q/H37Y/V38D/ V41R /D60aE/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157K	71.4		
576	F30Y/R35T/H37T/V38D/Y40H/ V41R /D60aP/Y60bD/L97bA/H99Q/C122S/Y149T/M157K	94.7		
584	F30Y/R36H/V38E/Y40H/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149N/L150V/M157K	49.3		
586	F30Y/R36H/V38E/Y40H/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C122S/S146F/M157K/Q192H/K243Q	24.1		

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- 1s-1)
587	F30Y/R36H/V38E/Y40H/ V41R /K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K/K187R	57.7		
591	F30Y/R36H/H37S/V38E/T39L/Y40H/ V41R /Y60bH/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	67.5		
592	F30Y/R35L/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/ V41R /Y60bA/T97aD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	77.9		
594	F30Y/R36H/H37E/V38E/T39Y/Y40H/ V41R /Y60bN/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	96.3		
595	F30Y/R36H/H37G/V38E/T39W/Y40H/ V41R /Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149Q/M157K	44.6		
597	F30Y/R36H/H37F/V38E/T39Y/Y40H/ V41R /Y60bD/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	16.8		
598	F30Y/R36H/H37N/V38E/T39Y/Y40H/ V41R /Y60bQ/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	51.4		
600	F30Y/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/ V41R /Y60bV/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	63.9		
601	F30Y/R36H/H37A/V38E/T39Y/Y40H/ V41R /Y60bQ/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	46.9		
603	F30Y/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/ V41R /Y60bN/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	56		

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- 1s-1)
604	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/ V41R /Y60bS/T97aL/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	18		
605	F30Y/R36H/V38E/T39V/Y40H/ V41R /Y60bH/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149S/M157K	99.7		
606	F30Y/R36H/H37E/V38E/T39F/Y40H/ V41R /Y60bN/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	56.4		
607	F30Y/R36H/H37G/V38E/T39Y/Y40H/ V41R /Y60bN/T97aA/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	64.2		
608	F30Y/R35I/R36H/H37E/V38E/T39Y/Y40H/ V41R /Y60bS/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	36.9		
611	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/ V41R /Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	12.7		
612	F30Y/R35W/R36H/H37Q/V38E/T39H/Y40H/ V41R /T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	30.3		
613	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/ V41R /Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	7.64		
614	F30Y/R35V/R36H/H37G/V38E/T39W/Y40H/ V41R /Y60bW/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149E/M157K	3.47		
615	F30Y/R35M/R36H/H37G/V38E/T39F/Y40H/ V41R /Y60bP/T97aF/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	11.7		

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- 1s-1)
616	F30Y/R35V/R36H/H37G/V38E/T39W/Y40H/ V41R /Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y 149R/M157K	8.3		
617	F30Y/R35V/R36H/H37S/V38E/T39F/Y40H/ V41R /Y60bS/T97aM/L97bA/H99Q/C122S/ Y149W/M157K	10.2		
618	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/ V41R /Y60bT/T97aD/L97bA/H99Q/C122S/Y 149R/M157K	41.3		
619	F30Y/R35L/R36H/H37G/V38E/T39Y/Y40H/ V41R /Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y 149M/M157K	22.1		
620	F30Y/R35F/R36H/H37G/V38E/T39Y/Y40H/ V41R /Y60bS/T97aD/L97bA/H99Q/C122S/ Y149R/M157K	36.7		
621	F30Y/R35V/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/ V41R /Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y 149E/M157K	25.4		
623	F30Y/R35V/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40H/ V41R /Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y 149R/M157K	22.6		
624	F30Y/R35V/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/ V41R /Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y 149R/M157K	9.54		
625	F30Y/R35V/R36H/H37G/V38E/T39L/Y40H/ V41R /Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y 149R/M157K/Q192T/R239H	60.1		
627	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39F/Y40H/ V41R /Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y 149R/M157K	15.4		

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- 1s-1)
628	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/ V41R /Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y 149R/M157K	13.5		
629	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39Y/Y40H/ V41R /Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y 149R/M157K/Q192M	70.8		
633	F30Y/R35Y/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/ V41R /Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y 149R/M157K	10.8		
645	R35W/H37D/V38D/T39Y/ V41R /Y60bS/L97 bA/H99Q/C122S/Y149R	37.4		
647	R35Q/H37N/V38D/T39Y/ V41R /Y60bP/L97 bA/H99Q/C122S	45.4		
648	R35W/H37D/V38D/T39Y/ V41R /Y60bH/L97 bA/H99Q/C122S/Y149R	44.2		
650	R35V/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40M/ V41 R /T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157 K	13.1		
651	F30Y/R35L/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M 157K/Q192N	80.9		
653	F30H/R35Q/R36H/H37Y/V38E/T39Y/Y40L/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M 157K	17.8		
656	R35Q/R36H/H37Y/V38E/T39Y/Y40L/ V41R / T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	7.33		
657	F30Y/R35L/R36H/H37E/V38E/T39N/Y40F/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M 157K	29.6		

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- 1s-1)
658	F30Y/R35I/R36H/H37D/V38E/T39F/Y40F/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	14.1		
661	F30H/R35L/R36H/H37E/V38E/T39F/Y40F/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	70.4		
663	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/ V41R /Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	45.8		
664	F30Y/R35W/R36H/H37E/S37dP/V38E/T39W/Y40H/ V41R /Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	16.8		
665	I24T/F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/ V41R /Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	20.6		
666	I24N/F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40L/ V41R /Y60bQ/N87D/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	18.2		
668	F30Y/R35W/H37Y/V38E/T39Y/Y40H/ V41R /Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	4.92		
669	F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/ V41R /Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	6.35		
670	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/ V41R /Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	8.44		
671	R35Y/R36H/H37S/V38D/T39Y/ V41R /Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	27.3		
672	R36H/H37S/V38E/T39W/ V41R /Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	54.1		

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- 1s-1)
673	R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/ V41R /Y60b N/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157 K	34		
675	R35W/R36N/H37S/V38E/T39Y/Y40M/ V41R /Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R /M157S	5.52		
676	R35W/R36Q/H37S/V38T/T39Y/Y40H/ V41R /Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R /Y151P/M157R	4.78		
677	F30Y/R35W/R36Q/H37S/V38P/T39Y/Y40L/ V41R /Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y 149R/M157R	7.55		
678	R35W/R36Q/H37S/V38P/T39Y/ V41R /Y60b N/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151 L	2.38		
679	F30H/R35W/R36T/H37S/V38P/T39Y/ V41R /Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R /Y151L/M157S	7.59		
680	F30Y/R35W/R36Q/H37S/V38E/T39Y/Y40L/ V41R /Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y 149R/Y151L/M157T/Q192H	12.4		
681	F30Y/R35W/R36K/H37S/V38D/T39Y/Y40L/ V41R /Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y 149R/Y151L/M157R/Q192T	15.9		
682	R35W/R36K/H37S/V38E/T39Y/Y40L/ V41R /Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R /Y151L/M157S/Q192H	5.01		
683	F30Y/R35W/R36S/H37S/V38Q/T39Y/Y40L/ V41R /Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y 149R/Y151L/M157S/Q192N	8.86		

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- 1s-1)
684	F30Y/R35W/R36Q/H37S/V38T/T39Y/Y40L/ V41R /Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y 149R/Y151L/M157K/Q192T	11.8		
685	R35W/R36K/H37S/V38A/T39Y/ V41R /Y60b N/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151 L/M157R/Q192T	13.3		
686	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/ V41R /Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y 149R/Y151P/M157K/Q192H	41		
687	R35W/R36Q/H37S/V38E/T39Y/Y40L/ V41R /Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R /Y151L/M157S/Q192T	19		
688	R35W/R36Q/H37S/V38S/T39Y/ V41R /Y60b N/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151 L/M157S/Q192H	8.04		
689	F30H/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40M / V41R /Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/ Y149R/M157K	13		
690	F30Y/R35W/R36T/H37S/V38S/T39Y/Y40L/ V41R /Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y 149R/Y151L/M157R/Q192Y	4.47		
693	F30Y/R35K/R36H/H37E/R37aK/V38E/T39F /Y40F/ V41R /D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H 99Q/C122S/Y149R/M157K	28.1		
694	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y /Y40F/ V41R /D60aP/Y60bG/T97aI/L97bA/ H99Q/C122S/Y149R/M157K	28.3		
695	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39I /Y40F/ V41R /D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/ H99Q/C122S/Y149M/M157K	69.2		

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- 1s-1)
696	F30Y/R35H/R36H/H37D/R37aE/V38E/T39Y /Y40F/ V41R /D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/ H99Q/C122S/Y149R/M157K	33.4		
697	H37M/R37aD/V38E/T39A/ V41R /D60aP/Y6 0bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	42.7		
698	R35F/H37D/R37aS/V38E/T39Y/ V41R /D60 aE/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149 R	63.4		
699	R35A/H37D/R37aN/V38E/T39F/ V41R /D60 aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149 R	65.8		
700	R35Q/H37D/R37aA/V38E/T39F/ V41R /D60 aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149 R	80.7		
701	R35W/H37D/R37aP/V38E/T39W/ V41R /D6 0aR/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y14 9R	11.8		
702	R35F/H37D/R37aN/V38E/T39Y/ V41R /Y60 bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	30.9		
703	R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/ V41R /D60a P/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149 R	10.3		
704	R35Q/H37Y/R37aD/V38E/T39L/ V41R /D60 aE/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149 R	29.4		
705	R35W/H37P/R37aG/V38E/T39Y/ V41R /D60 aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149 R	7.4		
706	N26D/F30Y/R35Y/R36H/H37E/V38E/T39F/ Y40F/ V41R /K61E/T97aI/L97bA/H99Q/R11 0dS/P114S/C122S/Y149R/M157K	10.3		

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- 1s-1)
707	F30Y/R35Y/R36H/H37N/V38E/T39F/Y40F/ V41R /K61E/R72H/T97aI/L97bA/H99Q/C12 2S/Y149R/M157K/Q169K	7.64		
708	F30Y/R35Y/R36H/H37E/V38E/T39F/Y40F/ V 41R /K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y14 9R/M157K/T242A	11.1		
709	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39F /Y40F/ V41R /D60aS/Y60bP/T97aE/L97bA/ H99Q/C122S/Y149R/M157K	55.3		
710	F30Y/R35M/R36H/H37D/R37aD/V38E/T39 Y/Y40F/ V41R /D60aP/Y60bS/T97aE/L97bA/ H99Q/C122S/Y149R/M157K	41.2		
711	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aN/V38E/T39Y /Y40F/ V41R /Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C 122S/Y149R/M157K	66.2		
712	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y /Y40F/ V41R /D60aP/Y60bS/T97aE/L97bA/ H99Q/C122S/Y149R/M157K	38.6		
713	F30Y/R35W/R36H/H37D/R37aE/V38E/T39 Y/Y40F/ V41R /D60aE/Y60bF/T97aE/L97bA/ H99Q/C122S/Y149R/M157K	21.8		
714	F30Y/R35Q/R36H/H37Y/R37aE/V38E/T39Y /Y40F/ V41R /D60aS/Y60bP/T97aE/L97bA/ H99Q/C122S/Y149R/M157K	18.1		
715	F30Y/R35Q/R36H/H37Y/R37aD/V38E/T39Y /Y40F/ V41R /Y60bV/T97aE/L97bA/H99Q/C 122S/Y149R/M157K	30.4		
716	F30Y/R35A/R36H/H37T/R37aD/V38E/T39Y /Y40L/ V41R /D60aP/Y60bE/T97aE/L97bA/ H99Q/C122S/Y149R/M157K	80.7		

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- s-1)
717	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40F/ V41R /Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/ N145S/S146V/T147M/D148G/Y149Q/L150 F/M157K	13.6		
718	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39F /Y40F/ V41R /D60aP/Y60bS/T97aE/L97bA/ H99Q/C122S/Y149R/M157K	38.2		
719	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aL/V38E/T39N /Y40F/ V41R /D60aP/Y60bT/T97aE/L97bA/ H99Q/C122S/Y149R/M157K	59.9		
720	F30Y/R35E/R36H/H37D/R37aN/V38E/T39Y /Y40F/ V41R /Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C 122S/Y149R/M157K	40		
721	F30Y/R36H/H37M/R37aD/V38E/T39G/Y40F / V41R /D60aP/Y60bE/T97aE/L97bA/H99Q/ C122S/Y149R/M157K	85.9		
722	F30Y/R35W/R36H/H37E/R37aP/V38E/T39Y /Y40F/ V41R /Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C 122S/Y149Q/M157K	47.7		
724	F30Y/R35Y/R36H/H37P/R37aQ/V38E/T39Y /Y40F/ V41R /Y60bH/T97aE/L97bA/H99Q/C 122S/Y149R/M157K	11.3		
725	F30Y/R35F/R36H/H37D/R37aD/V38E/T39H /Y40F/ V41R /D60aP/Y60bA/T97aE/L97bA/ H99Q/C122S/Y149R/M157K	71.3		
726	F30Y/R35Q/R36H/H37Y/R37aE/V38E/T39Y /Y40F/ V41R /D60aE/Y60bA/T97aE/L97bA/ H99Q/C122S/Y149R/M157K	29.3		
727	F30Y/R35W/R36H/H37P/R37aD/V38E/T39Y /Y40F/ V41R /D60aE/Y60bS/T97aE/L97bA/ H99Q/C122S/Y149R/M157K	8.9		

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- 1s-1)
728	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y /Y40F/ V41R /D60aA/Y60bS/T97aE/L97bA/ H99Q/C122S/Y149R/M157K	38.5		
729	F30Y/R35M/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y /Y40F/ V41R /D60aP/Y60bS/T97aE/L97bA/ H99Q/C122S/Y149R/M157K	22.9		
731	F30Y/R35W/R36H/H37P/R37aQ/V38E/T39 Y/Y40F/ V41R /Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/ C122S/Y149R/M157K	7.52		
732	F30Y/R35W/R36H/H37P/R37aE/V38E/T39Y /Y40F/ V41R /Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C 122S/Y149R/M157K	10.3		
733	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/ V41R /D60 aA/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149 R	17.4		
734	R35L/H37D/R37aS/V38E/T39Y/ V41R /D60 aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149 R	42.9		
735	R35M/H37G/R37aD/V38E/T39W/ V41R /D6 0aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y14 9R	42.3		
736	R35Q/H37G/R37aP/V38E/T39Y/ V41R /D60 aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149 R	29.2		
737	R35A/H37G/R37aE/V38E/T39F/ V41R /D60 aE/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149 R	51.1		
738	R35Q/H37S/R37aE/V38E/T39Y/ V41R /D60 aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149 R	26.3		

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- 1s-1)
740	R35Q/H37G/R37aE/V38E/T39H/ V41R /D60aP/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	80.1		
741	R35W/H37D/R37aS/V38E/T39Y/ V41R /D60aE/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	26.9		
742	R35Q/H37G/R37aE/V38E/T39Y/ V41R /D60aP/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	40.9		
743	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/ V41R /D60aG/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	18.1		
744	R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/ V41R /D60aP/Y60bL/D97T/T97aE/L97bG/A98S/H99L/C122S	6.17		
746	R35Y/H37V/R37aW/V38E/T39Y/ V41R /D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192T	11.6		
748	H37T/R37aL/V38E/T39Y/ V41R /D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192R	47.9		
749	R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/ V41R /D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L	0.92		
750	R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/ V41R /D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192H	5.26		
751	R35A/H37E/R37aG/V38E/T39Y/ V41R /D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L	4.76		

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- 1s-1)
752	R35W/H37G/R37aE/V38E/T39Y/ V41R /D60 aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151 L/Q192T	8.07		
753	R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/ V41R /D60a P/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	6.24		
754	R35A/H37T/R37aD/V38E/T39Y/ V41R /D60 aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151 L/Q192S	25.5		
792	R35Q/H37Y/R37aP/V38E/T39Y/ V41R /D60 aQ/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149 R	5.14		
793	R35N/H37S/R37aE/V38E/T39F/ V41R /D60 aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149 R	59.5		
794	R35H/H37P/R37aG/V38E/T39F/ V41R /D60 aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149 R	12.6		
795	R35Q/H37G/R37aD/V38E/T39Y/ V41R /D60 aP/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149 R	27.1		
796	R35L/H37D/R37aN/V38E/T39Y/ V41R /D60 aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	10.4		
797	R35N/H37T/R37aY/V38E/T39Y/ V41R /D60 aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149 R	28.7		
798	R35Q/H37D/R37aK/V38E/T39F/ V41R /D60 aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149 R	27.1		
799	R35Q/H37Y/R37aS/V38E/T39Y/ V41R /D60 aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149 R	8.95		

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- 1s-1)
800	R35Q/H37Y/R37aP/V38E/T39Y/ V41R /D60 aN/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y14 9R	14.5		
801	R35Q/H37S/R37aP/V38E/T39Y/ V41R /D60 aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149 R	33.8		
802	R35Y/H37D/V38E/T39W/ V41R /D60aP/Y60 bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	5.57		
807	V38E/T39L/ V41R /D60aP/Y60bD/T97aI/L9 7bA/H99Q/C122S/Y149V/Y151L/Q192T	71.1		
818	V38D/ V41R /Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C 122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	32		
821	V38D/ V41R /Y60bR/T97aW/L97bR/H99E/C 122S/E175D/R217E/K224R	14.8		
822	V38D/ V41R /Y60bS/T97aI/L97bR/H99E/C1 22S/Y151L/E175D/Q192F/R217E/K224R	42.1		
830	V38D/ V41R /L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R 217A	17.7		
831	V38D/ V41R /L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R 217E	9.09		
832	R35Q/V38D/ V41R /T97aS/L97bA/H99Q/C1 22S/Y151L	24.8		
834	R35Q/V38D/ V41R /L97bG/H99Q/C122S/Y1 51L	22.9		
835	R35S/V38D/ V41R /L97bA/H99Q/C122S/Y1 51L	25.7		
839	R35K/V38D/Y40H/ V41R /Y60bS/L97bG/H9 9Q/C122S	75.6		
849	V38D/ V41R /Y60bR/L97bR/H99E/C122S/Y 151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	66.2		

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- 1s-1)
855	V38D/ V41R /Y60bR/L97bR/H99L/C122S/Y151L/E175D/Q192Y/R217E/K224R	94.9		
868	V38D/T39W/Y40L/ V41R /T97aL/L97bA/H99Q/C122S	48.9		
869	V38D/T39F/Y40L/ V41R /T97aW/L97bA/H99Q/C122S	37.8		
871	R37aS/V38D/T39Y/Y40M/ V41R /T97aL/L97bA/H99Q/C122S	81.2		
872	V38D/T39L/Y40L/ V41R /T97aV/L97bA/H99Q/C122S	41.6		
873	V38D/T39L/Y40L/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C122S	38.2		
874	V38D/T39L/Y40L/ V41R /T97aW/L97bA/H99Q/C122S	49.1		
875	V38D/T39Y/Y40H/ V41R /T97aI/L97bA/H99Q/C122S	30.7		
876	V38D/T39Y/Y40L/ V41R /T97aW/L97bA/H99Q/C122S	38.4		
877	V38D/T39Y/Y40M/ V41R /T97aW/L97bA/H99Q/C122S	50.1		
878	V38D/T39Y/Y40L/ V41R /T97aE/L97bA/H99Q/C122S	37.8		
879	V38D/T39Y/Y40M/ V41R /T97aE/L97bA/H99Q/C122S	45		
881	V38D/ V41R /L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217E	31.5		
882	V38D/ V41R /L97bR/H99E/C122S/Y151L/R217E	11.4		
884	V38D/ V41R /L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217V	33.7		

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- 1s-1)
900	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/ V41R /Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	50.9		
901	R35Q/H37G/R37aE/V38Y/T39H/ V41R /Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	67.6		
902	R35K/H37A/R37aE/V38H/T39Y/ V41R /Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	55.9		
903	R35Q/H37G/R37aE/V38Y/T39F/ V41R /Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	60.1		
904	R35Q/H37G/R37aE/V38W/T39Y/ V41R /Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	44.6		
924	R36S/V38D/T39L/Y40L/ V41R /L97bI/H99E/C122S/R217T	31.5		
925	R37aS/V38D/T39Y/Y40F/ V41R /H99L/C122S/R217T	49.9		
926	V38D/T39Y/Y40L/ V41R /L97bI/H99E/C122S/R217E	12.8		
932	R37aS/V38D/T39Y/ V41R /L97bI/H99E/C122S/R217T	70.1		
949	R37aS/V38E/Y40V/ V41R /H99L/C122S/Y151L/R217V	9.04		
950	V38E/Y40L/ V41R /H99L/C122S/Y151L/R217S	16.1		
951	R36L/V38E/Y40Q/ V41R /L97bG/H99Q/C122S/Y151P/R217S	63.7		
958	R36S/V38E/Y40Q/ V41R /L97bG/H99L/C122S/Y151P/R217E	34.3		

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M- 1s-1)
972	V38E/T39W/ V41R /D60aP/Y60bD/L97bA/H99L/C122S	33.5		
973	V38E/T39Y/ V41R /D60aW/Y60bP/L97bR/H99I/C122S	16.4		
975	V38E/T39L/ V41R /D60aN/Y60bP/L97bG/H99Q/C122S	46.8		
977	V38E/T39W/ V41R /D60aW/Y60bP/L97bG/H99L/C122S	4.94		
978	R35H/V38E/T39Y/ V41R /D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/I138V/E167K	12.1		
979	R35H/V38E/T39Y/ V41R /D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158S/E167K	10.6		
980	R35H/G37bD/V38E/T39Y/ V41R /D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158S	12.4		
981	R35H/V38E/T39Y/ V41R /D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158A	7.23		
982	R35H/V38E/T39Y/ V41R /T56A/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S	19.9		
983	R35H/V38E/T39Y/ V41R /T56S/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158S	14.6		
984	R37aH/V38E/T39Y/ V41R /T56A/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158A	28.8		
985	R37aH/V38E/T39Y/ V41R /D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S	90.7		
986	R35H/V38E/T39Y/ V41R /D60aP/Y60bQ/P60cS/L97bA/H99Q/C122S/I138V/E167K	19.4		

Como se ha discutido en la solicitud y en los argumentos anteriormente presentados, la solicitud proporciona polipéptidos u-PA modificados que comprenden la modificación V41R y que muestran actividad en la cisión de C3 y a concentraciones relativamente bajas. La característica técnica común compartida entre todos los polipéptidos

reclamados es un polipéptido u-PA modificado que comprende V41R y escinde e inactiva C3. La u-PA de tipo silvestre esencialmente no escinde C3 (véanse los datos reproducidos previamente). Los datos de la solicitud demuestran el aumento en la especificidad para C3.

Los polipéptidos u-PA modificados reivindicados constituyen un conjunto unificado, novedoso y no evidente frente al arte citado, así como frente a cualquier otro estado de la técnica del que el solicitante tenga conocimiento. El documento D1 (US 2006/0142195) se limita a enseñar modificaciones de u-PA destinadas a potenciar sus actividades nativas como activador de plasminógeno y a su uso terapéutico en la modulación de la coagulación. En ningún momento D1 sugiere ablacionar dichas actividades nativas ni utilizar u-PA como andamiaje para introducir una nueva función enzimática.

La u-PA no modificada no escinde la proteína del complemento C3, ni reconoce su sitio de escisión. Esto se evidencia claramente en los datos experimentales reproducidos de las Tablas 14, 19 y 20, donde el polipéptido tipo silvestre (SEQ ID NO:5) no presenta actividad de escisión sobre C3. En marcado contraste, los polipéptidos u-PA modificados que incorporan las combinaciones de mutaciones definidas en las reivindicaciones muestran valores de ED₅₀ significativamente bajos, lo que refleja una alta actividad y especificidad para la escisión de C3.

SEQ ID NO*	Cadena de mutación	Tabla 14 ED ₅₀ (nM)	Tabla 19 ED ₅₀ 80% plasma humano (60 min, nM)	Tabla 20 k _{cat} /k _m (M-1s-1)
5	U-PA de tipo silvestre (dominio proteasa) con C122S	N/A (>3500)	> 6000	1.54E+04

Como se explica en la solicitud, el SEQ ID NO 5 incluye la mutación C122S, que no afecta a la actividad, pero se incluye para evitar la agregación y permitir que se realicen experimentos *in vitro*. El u-PA de tipo silvestre no tiene actividad para escindir C3.

D1 enseña variantes de la uroquinasa modificadas para tener mayor especificidad para fibrina, en comparación con el fibrinógeno, lo que hace que la u-PA no sea neurotóxica

para el tratamiento del ictus. D1 no revela, enseña ni sugiere un u-PA modificado que tenga actividad y/o especificidad para escindir C3 con el fin de inhibir el complemento, ni D1 enseña ni sugiere reemplazar su actividad nativa por una nueva. No hay divulgación, enseñanza ni sugerencia en D1 de una u-PA modificada que comprenda V41R, ni ninguna de las modificaciones mencionadas en las reivindicaciones, y que tenga actividad y/o especificidad para la proteína del complemento C3. D1 no revela, enseña ni sugiere un polipéptido u-PA modificado en el que la actividad nativa haya sido ablacionada. Por el contrario, los polipéptidos u-PA modificados reivindicados en la presente solicitud carecen de la actividad nativa de u-PA y, en consecuencia, no pueden emplearse para el tratamiento de accidentes cerebrovasculares mediante la modulación de la coagulación. Así, mientras D1 persigue potenciar o preservar la función fisiológica de u-PA como activador de plasminógeno, la invención reivindicada se dirige a un cambio funcional fundamental, en el que la actividad nativa es eliminada y sustituida por una nueva especificidad enzimática dirigida a la escisión de C3.

D1 enseña que su uroquinasa modificada de SEQ ID NO: 2, que es diferente de la u-PA establecida en la solicitud actual y que comprende sustituciones en las posiciones 420-423, muestra un aumento en la actividad de activación del plasminógeno en presencia de fibrina. Las reivindicaciones indican que la actividad del factor activador de plasminógeno modificado [u-PA] "*se incrementa más de 650 veces en presencia de fibrina*" en comparación con la uroquinasa silvestre. Esto contrasta con la presente solicitud en la que se emplea u-PA como sustrato para modificar su actividad y/o especificidad al sustrato, de modo que corte un sustrato objetivo, C3, y no corte el plasminógeno nativo del sustrato. D1 no enseña ni sugiere modificar u-PA para eliminar su actividad.

No hay divulgación, enseñanza ni sugerencia en D1 de modificar u-PA para eliminar su especificidad de sustrato para plasminógeno, de modo que no pueda usarse para alterar la coagulación en el tratamiento del ictus. D1 no revela, enseña ni sugiere la modificación V41R, ni ninguna de las modificaciones o combinaciones de aminoácidos mencionadas en las reivindicaciones originales o modificadas, incluidas las reivindicaciones dependientes, ni ninguna modificación para introducir la capacidad de escindir e inactivar C3. Como se describe a continuación, la modificación V41R, así como cada uno de los reemplazos R35Q, H37Y, V38E, T39Y, D60aP, L97bA, T97aI y H99Q que se reclaman en las reivindicaciones originales. Los polipéptidos, según se afirma, tienen actividad y especificidad del sustrato alteradas, de modo que los polipéptidos escinden C3 e inactivan cada uno. D1 se centra en aumentar la actividad de u-PA frente a su sustrato nativo, el plasminógeno, en presencia de fibrina. En ningún punto D1 sugiere ablacionar la actividad nativa de u-PA ni redirigir su actividad o especificidad de sustrato para escindir e inactivar C3, que constituye un sustrato no nativo de u-PA.

Por el contrario, D1 parte de la premisa de conservar y potenciar la función fisiológica de u-PA, lo que se aleja conceptualmente del enfoque de la presente invención, en la que la actividad nativa es eliminada y sustituida por una nueva actividad dirigida específicamente contra C3.

Así, una característica técnica común compartida entre todos los polipéptidos reclamados es un polipéptido u-PA modificado que escinde C3 (todos comparten esta propiedad) y todos comprenden V41R, que aumenta la actividad para C3 25-27 veces, y todos cortan e inactivan C3. D1 no revela, enseña ni sugiere la modificación V41R, ni sus efectos en la escisión de inactivación de C3. Los polipéptidos reclamados no reconocen el sustrato nativo ni el receptor (plasminógeno, u-PA, respectivamente) para u-PA. El V41R modificado hace que el polipéptido no sea adecuado para el tratamiento del ictus a través de la vía de coagulación. No hay divulgación, enseñanza ni sugerencia en D1 de una u-PA modificada que corte e inactive la proteína del complemento C3. Como se ha descrito anteriormente, los polipéptidos de u-PA que componen la modificación V41R aumentan la escisión de C3 entre 25 y 27 veces en comparación con el residuo de u-PA de tipo silvestre en esa posición. Esta modificación de la u-PA es novedosa y poco evidente sobre el arte citado, y cualquier arte del que el solicitante tenga conocimiento. Ni D1 ni ningún otro arte del que el solicitante tenga conocimiento enseña ni sugiere ninguno de los polipéptidos y combinaciones de modificaciones mencionadas en las reivindicaciones dependientes.

En conclusión, la unidad de invención se basa en una característica técnica común, no en secuencias individuales. Según la Decisión 486 de 2000 de la Comunidad Andina, una solicitud de patente debe estar relacionada con una invención, o un grupo de invenciones vinculadas para formar un concepto inventivo general único. Todos los grupos respectivos, como se ha discutido extensamente anteriormente, están unidos en que son polipéptidos U-PA que han sido modificados y, como resultado de sus modificaciones, pueden escindir la proteína C3 del complemento. Así, los polipéptidos u-PA modificados reclamados son unificados, novedosos y poco evidentes respecto a la documentación citada. En vista de las observaciones aquí expuestas, el solicitante solicita respetuosamente la reconsideración de los rechazos.

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

8. Nivel inventivo

El examinador ha indicado que las reivindicaciones 1 a 12, 14 a 77 y 92 a 95 carecerían de nivel inventivo en vista de las enseñanzas del documento D1 (US20060142195) 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.

Objeción del examinador

El Examinador considera que el documento D1 constituye el estado de la técnica más cercano, dado que divulga un activador del plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA) modificado que comprende diversas sustituciones de aminoácidos, así como modificaciones alternativas, y demuestra que cambios específicos en el bucle de autólisis conducen a un aumento significativo de la especificidad por fibrina en comparación con el u-PA de tipo silvestre.

Según el Examinador, la diferencia entre la reivindicación 1 y el u-PA divulgado en D1 radica en (i) el uso de una secuencia base no modificada correspondiente a las SEQ ID NO: 1-6 y (ii) la combinación específica de sustituciones F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K. No obstante, el Examinador sostiene que la solicitud no aporta evidencia de que dichas sustituciones, individualmente o en combinación, confieran un efecto técnico distinto o superior al ya obtenido en D1, señalando además que la memoria atribuye un efecto funcional conocido únicamente a la sustitución C122S.

En consecuencia, el Examinador formula el problema técnico objetivo como la mera provisión de un polipéptido u-PA modificado alternativo al divulgado en D1. A este respecto, considera que el documento D3 enseña precisamente estrategias alternativas de modificación, incluyendo sustituciones en la posición 41 y en otros residuos, así como la obtención de variantes de u-PA con capacidad de escindir proteínas del complemento como C2 o C3, junto con la divulgación de ácidos nucleicos, vectores, células huésped, composiciones, kits y combinaciones terapéuticas.

Dado que D3 propone modificaciones alternativas, incluidas explícitamente en la posición 41, el Examinador considera que una persona experta en la materia estaría motivada a introducir sustituciones análogas a las enseñadas en D3 en los u-PA modificados de D1, llegando así al polipéptido de la reivindicación 1 sin actividad inventiva. Asimismo, estima que las reivindicaciones dependientes no incorporan características adicionales que confieran nivel inventivo.

En relación con la reivindicación 38, dirigida a una proteína de fusión que comprende el u-PA modificado, el Examinador vuelve a considerar a D1 como el estado de la técnica más cercano y señala que las diferencias consisten en el uso de las SEQ ID NO: 1-6, la misma combinación de sustituciones y la fusión del u-PA modificado a un polipéptido no proteasa. Sin embargo, sostiene que no se demuestra ningún efecto técnico inesperado o mejorado derivado de dicha fusión. Además, destaca que D3 divulga explícitamente proteínas de fusión que comprenden u-PA modificado, incluyendo fusiones con dominios Fc, GST y secuencias señal.

En vista de lo anterior, el Examinador concluye que una persona versada en la materia estaría igualmente motivada a combinar las enseñanzas de D1 y D3, llegando de manera obvia tanto al objeto de la reivindicación 1 como al de la reivindicación 38, así como a sus reivindicaciones dependientes, las cuales considera que tampoco aportan nivel inventivo.

La materia reclamada es inventiva a la luz del arte previo citado

El solicitante respetuosa y enfáticamente manifiesta su desacuerdo con la opinión del examinador. El efecto técnico que cambia la actividad/especificidad del sustrato de u-PA de un sustrato nativo u-PA a uno no nativo e identifica que

- 1) esto es posible, y
- 2) que u-PA puede modificarse para escindir C3, y
- 3) identifica modificaciones de aminoácidos para efectuar la ablación de la actividad

nativa, de modo que efectivamente escinda e inactive C3 para inhibir la activación del complemento.

Ni la referencia (ni D2, ya mencionada) enseña ni sugiere modificaciones de u-PA para lograr este cambio.

D1, como se ha indicado anteriormente, no tiene relevancia para el tema reclamado en la presente invención. Aunque D1 describe la modificación de un polipéptido u-PA, **ninguna** de las modificaciones se comparte entre D1 y la solicitud instantánea, y **las modificaciones de aminoácidos descritas en D1 tienen efectos completamente diferentes**. D1 se modifica para mejorar la actividad nativa de u-PA, aumentando su eficacia como activador de plasminógenos, mientras que los polipéptidos reclamados en la presente invención han perdido la actividad nativa de unión al plasminógeno y presentan nueva actividad de unión y escisión para la proteína C3 del complemento.

Diferencias entre las enseñanzas de la D1 y la D3 y las reivindicaciones actuales

D1: Publicación de patentes estadounidenses nº 2006/0142195

D1 modifica polipéptidos que son activadores de plasminógeno para el tratamiento del ictus alterando la coagulación sanguínea, reduciendo así su neurotoxicidad. D1 enseña el uso y la producción de factores activadores de plasminógeno para el tratamiento del ictus. D1 enseña que la activación del plasminógeno es catalizada por u-PA (activador de plasminógeno tipo uroquinasa) y t-PA (activador de plasminógeno tisular). D1 enseña reemplazos que convierten a la u-PA en una mejor enzima u-PA para tratar el ictus. D1 potencia la actividad nativa; La solicitud instantánea abla deliberadamente la actividad nativa de u-PA. No se sugiere alterar la actividad o especificidad de la u-PA para escindir un sustrato completamente diferente, como C3, para dirigirse a una vía no relacionada con la coagulación, ni tampoco se sugiere modificaciones que provoquen tal cambio.

Enseñanza de la referencia citada y diferencias respecto a las reivindicaciones actuales

D1: Publicación de patentes estadounidenses nº 2006/142195

D1 modifica polipéptidos que son activadores de plasminógeno para el tratamiento del ictus alterando la coagulación sanguínea, reduciendo así su neurotoxicidad. D1 enseña el uso y la producción de factores activadores de plasminógeno para el tratamiento del ictus. D1 enseña que la activación del plasminógeno es catalizada por u-PA (activador de plasminógeno tipo uroquinasa) y t-PA (activador de plasminógeno tisular). D1 enseña reemplazos que convierten a la u-PA en una mejor enzima u-PA para tratar el ictus. D1 potencia la actividad nativa; la solicitud instantánea abla la actividad nativa. No se sugiere alterar la actividad o especificidad de la u-PA para cortar un sustrato completamente diferente, como C3, ni tampoco modificaciones que provoquen tal cambio.

D1 enseña una uroquinasa modificada (SEQ ID NO: 2 de D1), que difiere de la secuencia de u-PA descrita en la presente solicitud, e incorpora sustituciones en las posiciones 420–423 destinadas a **aumentar la actividad de activación del plasminógeno en presencia de fibrina**. D1 no contiene ninguna enseñanza ni sugerencia de un u-PA modificado en el que se elimine o abla su actividad nativa, ni divulga un polipéptido u-PA modificado que comprenda la sustitución V41R, ni las combinaciones de modificaciones reivindicadas en la presente solicitud. Asimismo, D1 no sugiere modificaciones orientadas a introducir actividad y/o especificidad frente a la proteína C3 del complemento, ni a redirigir la especificidad de sustrato de u-PA hacia un sustrato no nativo. En consecuencia, D1 no enseña ni sugiere un polipéptido u-PA modificado cuya actividad nativa haya sido ablada. Por el contrario, los polipéptidos u-PA modificados reivindicados en la presente solicitud carecen de actividad nativa como activadores de plasminógeno, y, por tanto, no son aptos para el tratamiento de accidentes cerebrovasculares mediante la modulación de la coagulación, lo que subraya aún más la distancia técnica y funcional respecto de D1.

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

solicitud tienen una reducción o eliminación sustancial de la actividad del plasminógeno en comparación con el polipéptido u-PA del SEQ ID NO:5 (el dominio proteasa con el reemplazo de C122S). En la práctica, como se puede ver en los datos, **los polipéptidos u-PA modificados de solicitud instantánea tienen actividades para escindir C3 que son muchas veces, hasta 1000 veces o más que la actividad de u-PA no modificada para C3, y no escinden plasminógeno.**

Las reivindicaciones en D1 indican que la actividad del factor activador de plasminógeno modificado (u-PA) "*se incrementa más de 650 veces en presencia de fibrina*" en comparación con la uroquinasa de tipo silvestre. Esto contrasta con la presente solicitud en la que el u-PA modificado no reconoce el plasminógeno y se modifica para alterar su actividad y/o especificidad del sustrato de modo que corte un sustrato objetivo, C3, y no corte el plasminógeno nativo del sustrato. **D1** no enseña ni sugiere modificar u-PA para eliminar su actividad.

D1 no enseña ni sugiere un u-PA modificado que tenga actividad y/o especificidad para C3, un sustrato completamente diferente en una vía completamente distinta. No hay enseñanza ni sugerencia en D1 de una u-PA modificada que tenga ninguna de las modificaciones mencionadas y una mayor actividad/especificidad para una proteína del complemento que sea C3, en comparación con un polipéptido u-PA no modificado. D1 no enseña ni sugiere un polipéptido u-PA modificado que tenga actividad reducida o nula para el sustrato nativo, plasminógeno.

D1 enseña polipéptidos u-PA modificados que **mantienen** la especificidad del sustrato de u-PA y tienen una actividad aumentada para el sustrato nativo; D1 proporciona a los polipéptidos u-PA sus propiedades nativas. En la solicitud actual, el polipéptido u-PA es un andamiaje sobre el que se confiere nueva actividad y especificidad del sustrato, para la proteína del complemento C3; los polipéptidos reclamados no reconocen el plasminógeno como sustrato. D1, por tanto, proporciona reemplazos de u-PA que no pueden ni sugieren ninguna de las modificaciones en los polipéptidos modificados de u-PA proporcionados y reclamados en la solicitud actual.

D1 no menciona C3 como objetivo para u-PA. No se menciona en D1 el uso de u-PA, como un polipéptido modificado de u-PA, para inhibir la activación del complemento. D1 no enseña ni sugiere **ninguna** de las modificaciones o combinaciones de aminoácidos identificadas en la solicitud actual, ni su impacto en la escisión de C3. D1 no menciona ninguna de las modificaciones de V41 ni las mencionadas combinaciones de modificaciones de aminoácidos, que incluyen modificaciones como R35, H37, Y40, D10a, L97b, T97a o H99 como residuo para aumentar la actividad y/o especificidad de C3. D1 se ocupa del aumento de la actividad de u-PA para su sustrato nativo, el

plasminógeno, en presencia de fibrina. No hay ninguna sugerencia en D1 de ablar su actividad nativa ni alterar su actividad/especificidad del sustrato para un sustrato no nativo, como C3.

D1 enseña variantes de la uroquinasa con mayor actividad fibrina, en comparación con el fibrinógeno, para así aumentar la escisión del plasminógeno y disminuir la neurotoxicidad, para su uso en el tratamiento del ictus. D1 no enseña ni sugiere ablar la actividad nativa de la u-PA ni modificar su especificidad del sustrato para que escinda e inactive la proteína del complemento C3 para inhibir el complemento. Como se describe en la solicitud, la escisión de proteínas del complemento, como la C3, es un objetivo para el tratamiento de trastornos que implican activación del complemento, como la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE) y la función tardía del injerto (DGF). La solicitud muestra que las modificaciones listadas en las reivindicaciones aumentan significativamente la actividad de escisión de C3 en un sitio que lo inactiva. D1 no enseña ni sugiere ninguna de las modificaciones reclamadas, ni los reemplazos particulares que contienen, ni su efecto en la actividad y/o especificidad de C3. Como se ha señalado anteriormente, todos los polipéptidos de la solicitud fueron seleccionados por su capacidad para reconocer el sitio de la escisión en C3.

D1 enseña que su uroquinasa modificada es de SEQ ID N.º2 en ella, lo cual es **diferente de la secuencia de u-PA establecida en la solicitud actual**, que comprende sustituciones en las posiciones 420-423, las cuales **aumentan la actividad de activación del plasminógeno** en presencia de fibrina. No hay enseñanza ni sugerencia en D1 de un u-PA modificado en el que se elimine la actividad nativa, ni de un polipéptido u-PA modificado que comprende V41R, ni ninguna de las combinaciones de modificaciones mencionadas, ni ninguna sugerencia de modificaciones que introduzcan actividad y/o especificidad para la proteína C3 del complemento. D1 no enseña ni sugiere un polipéptido u-PA modificado en el que su actividad nativa esté ablada. Los polipéptidos u-PA modificados, como los afirmados al instante, no tienen su actividad nativa y no pueden usarse para tratar accidentes cerebrovasculares alterando la actividad de coagulación.

D1 no menciona en absoluto el sistema del complemento ni la proteína C3. Las modificaciones divulgadas en D1 están dirigidas exclusivamente a aumentar la especificidad y/o actividad enzimática de u-PA frente a su sustrato nativo, el plasminógeno, y corresponden a reemplazos de aminoácidos **en posiciones completamente distintas de aquellas reivindicadas en la presente solicitud**. En consecuencia, D1 no enseña ni sugiere un u-PA modificado que comprenda cualquiera de las modificaciones definidas en las reivindicaciones 1 o 2, ni puede interpretarse razonablemente que divulgue o sugiera un u-PA modificado con actividad y/o

especificidad aumentada para la proteína C3 del complemento, que es un sustrato no nativo.

Asimismo, D1 no enseña ni sugiere una u-PA modificada que presente mayor actividad y/o especificidad frente a una proteína del complemento, en particular C3, en comparación con el polipéptido u-PA no modificado representado por cualquiera de los SEQ ID NO: 1-6, ni con un fragmento catalíticamente activo que carezca de las modificaciones reivindicadas. Tal como se demuestra en la presente solicitud, los polipéptidos u-PA modificados reivindicados presentan una reducción sustancial o una eliminación completa de la actividad de escisión del plasminógeno, en comparación con el polipéptido u-PA del SEQ ID NO: 5 (dominio proteasa que comprende el reemplazo C122S). En la práctica, y como se evidencia en los datos experimentales, los polipéptidos u-PA modificados de la presente solicitud **divulgan actividades de escisión de C3 que son múltiples órdenes de magnitud superiores, hasta 1000 veces o más, a cualquier actividad observable de u-PA no modificada frente a C3, y, de manera crítica, los polipéptidos reivindicados no escinden plasminógeno.**

Las reivindicaciones en D1 indican que la actividad del factor activador de plasminógeno modificado (u-PA) "*se incrementa más de 650 veces en presencia de fibrina*" en comparación con la uroquinasa de tipo silvestre. Esto contrasta con la solicitud instantánea en la que el u-PA modificado no reconoce el plasminógeno y se modifica para alterar su actividad y/o especificidad del sustrato de modo que escinde un sustrato objetivo no nativo, C3, y no escinde el plasminógeno nativo del sustrato. D1 no enseña ni sugiere modificar u-PA para eliminar su actividad.

D1 no enseña ni sugiere un u-PA modificado que tenga actividad y/o especificidad para C3, un sustrato completamente diferente en una vía completamente distinta. No hay enseñanza ni sugerencia en D1 de una u-PA modificada que tenga ninguna de las modificaciones mencionadas y una mayor actividad/especificidad para una proteína del complemento que sea C3, en comparación con un polipéptido u-PA no modificado. D1 no enseña ni sugiere un polipéptido u-PA modificado que tenga actividad reducida o nula para el sustrato nativo, plasminógeno.

D1 enseña polipéptidos u-PA modificados que mantienen la especificidad del sustrato de u-PA y tienen una actividad aumentada para el sustrato nativo; D1 proporciona a los polipéptidos u-PA sus propiedades nativas. En la solicitud actual, el polipéptido u-PA es un andamiaje sobre el que se confiere nueva actividad y especificidad del sustrato, para la proteína del complemento C3; los polipéptidos reclamados no reconocen el plasminógeno como sustrato. D1, por tanto, proporciona reemplazos de u-PA que no

pueden ni sugieren ninguna de las modificaciones en los polipéptidos modificados de u-PA proporcionados y reclamados en la solicitud actual.

En resumen, D1 no menciona C3 como objetivo para u-PA. No se menciona en D1 el uso de u-PA, como un polipéptido modificado de u-PA, para inhibir la activación del complemento. D1 no enseña ni sugiere ninguna de las modificaciones o combinaciones de aminoácidos identificadas en la solicitud actual, ni su impacto en la escisión de C3. D1 no menciona ninguna de las modificaciones de V41 ni las mencionadas combinaciones de modificaciones de aminoácidos, que incluyen modificaciones como R35, H37, Y40, D10a, L97b, T97a o H99 como residuo para aumentar la actividad y/o especificidad de C3. D1 se ocupa del aumento de la actividad de u-PA para su sustrato nativo, plasminógeno, en presencia de fibrina para su uso en el tratamiento del ictus a través de la vía de coagulación. No hay ninguna sugerencia en D1 de ablar su actividad nativa ni alterar su actividad/especificidad del sustrato para un sustrato no nativo, como C3.

D1 enseña variantes de la uroquinasa que tienen mayor actividad de fibrina, en comparación con el fibrinógeno, para así aumentar la escisión del plasminógeno y disminuir la neurotoxicidad, para su uso en el tratamiento del ictus. D1 no enseña ni sugiere ablar la actividad nativa de la U-PA ni modificar su especificidad del sustrato para que corte e inactive la proteína del complemento C3 para inhibir el complemento. Como se describe en la solicitud, la escisión de proteínas del complemento, como la C3, es un objetivo para el tratamiento de trastornos que implican activación del complemento, como la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE) y la función tardía del injerto (DGF). La solicitud muestra que las modificaciones listadas en las reivindicaciones aumentan significativamente la actividad de escisión de C3 en un sitio que lo inactiva. D1 no enseña ni sugiere ninguna de las modificaciones reclamadas, ni los reemplazos particulares que contienen, ni su efecto en la actividad y/o especificidad de C3. Como se ha señalado anteriormente, todos los polipéptidos de la solicitud fueron seleccionados por su capacidad para reconocer el sitio de la escisión en C3.

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

D3 está dirigida a la modificación de proteasas no pertenecientes al sistema del complemento con el fin de inhibir la activación del complemento. En particular, D3 proporciona una lista de proteínas ejemplares no complementarias (véase página 14, líneas 1-15 de la solicitud PCT de D3), pero selecciona y se centra exclusivamente en la modificación de la proteasa MTSP-1 para lograr dicho efecto.

En los ejemplos de D3, se evaluó mediante ensayos hemolíticos un panel de polipéptidos MTSP-1 modificados con el fin de identificar aquellos capaces de inhibir la activación del complemento. D3 no menciona a u-PA como un andamiaje susceptible de modificación, y únicamente hace referencia a u-PA (o m-PA) de manera incidental, en relación con su participación indirecta en la actividad de MTSP-1 in vivo. D3 no divulga ni proporciona ningún polipéptido u-PA modificado. Tras identificar polipéptidos MTSP-1 modificados con capacidad de inhibir el complemento, D3 identifica posteriormente los sustratos escindidos por dichos polipéptidos MTSP-1 modificados. La mayoría de ellos escinden C2, y únicamente tres muestran escisión de C3. D3 concluye que la combinación específica de modificaciones en los residuos K224 y Y146 de MTSP-1 es determinante para la escisión de C3 por los polipéptidos MTSP-1 modificados.

Sin embargo, u-PA no contiene un residuo equivalente a Y146, y MTSP-1 es una proteasa distinta y no homóloga a u-PA. **En consecuencia, las conclusiones extraídas en D3 respecto de MTSP-1 no son trasladables ni relevantes para la modificación de u-PA con el fin de conferir actividad de escisión de C3.** De manera coherente con ello, ninguno de los polipéptidos u-PA modificados reivindicados comprende modificaciones en residuos equivalentes a la combinación K224/Y146 descrita en MTSP-1. Por tanto, D3 no enseña, no sugiere ni motiva la modificación de u-PA para conferirle actividad de escisión sobre C3, ni proporciona indicación alguna que conduzca de manera evidente a los polipéptidos u-PA modificados reivindicados en la presente solicitud.

D3 se dirige a modificar proteasas no complementarias para aumentar la especificidad de un sustrato objetivo o la actividad en inhibir la activación del complemento. Los polipéptidos fueron seleccionados mediante un ensayo de hemólisis que no se dirigieron a una proteína específica del complemento. En los ejemplos de D3, un panel de polipéptidos MTSP-1 modificados es evaluado mediante ensayos hemolíticos para identificar cualquiera que inhiba la activación del complemento. D3 no proporciona polipéptidos u-PA modificados, ni polipéptidos u-PA modificados con mayor actividad y/o especificidad para C3. D3 no enseña ni puede sugerir ninguno de los reemplazos requeridos en las reivindicaciones actuales ni la combinación de modificaciones mencionadas, porque D3 no enseña ni sugiere reemplazos en un polipéptido u-PA. D3 no enseña ni puede enseñar el efecto de ninguno de los reemplazos recitados respecto a la actividad de la escisión y/o la especificidad de C3.

D3 no enseña ni puede sugerir ninguno de los reemplazos requeridos en las reivindicaciones actuales ni la combinación de modificaciones mencionadas, porque D3 no enseña ni sugiere ningún polipéptido u-PA modificado que corte C3. Los reemplazos identificados en D3 son para modificar MTSP-1 y no corresponden a ninguna posición

reclamada en la presente solicitud. D2 no enseña ni puede enseñar el efecto de ninguno de los reemplazos recitados respecto a la actividad de la escisión y/o la especificidad de C3.

El número de acceso de Uniprot A0A2R9BBQ2 establece la secuencia de la forma madura del *chimpancé pigmeo* de tipo silvestre (*Bonobo*) u-PA, que incluye una L en el residuo 41, no ofrece ninguna enseñanza ni sugerencia, sola o en combinación con D1 y/o D3, que resulte en ninguno de los polipéptidos reclamados instantáneamente, todos los cuales escinden C3, no plasminógeno. Esto demuestra aún más la importancia de la V41R en la alteración de la actividad de la u-PA, ya que Bonobo u-Pa, que contiene V41L, funciona como enzima u-PA. La secuencia Uniprot sola o en cualquier combinación con cualquiera de las referencias adicionales D1, D3 o cualquier otra referencia registrada, no enseña ni sugiere una u-PA modificada que tenga ninguna de las modificaciones y la actividad o especificidad aumentadas para una proteína del complemento que sea C3.

Análisis

Las enseñanzas de D1 y D3, individualmente o en cualquier combinación o con cualquier otra referencia, no dan lugar a los polipéptidos u-PA modificados instantáneamente

Ni D1 ni D3 enseñan ni sugieren una modificación en el polipéptido u-PA que sean V41R, R35Q, H37Y, Y40Q, D60aP, L97bA, T97aI y H99Q, como se afirmó originalmente, o que comprenden V41R o tres combinaciones de mutaciones en las reclamaciones pendientes. No existe ninguna combinación de D1 y D3 que resulte en los polipéptidos reclamados instantáneamente que incluyen V41R ni las combinaciones de reemplazos. D1 proporciona polipéptidos u-PA modificados que se modifican para optimizar su actividad nativa en el tratamiento del ictus. D3 se centra en la vía del complemento, pero proporciona polipéptidos MTSP-1 modificados. D3 no menciona u-PA. Todo el estado de la técnica en lo que respecta a la PA está dirigida a mejorar su actividad para sus sustratos nativos para mejorar su actividad como terapéutico en el tratamiento de condiciones que implican coágulos sanguíneos indeseables; no hay ninguna sugerencia en ningún arte para usar u-PA como andamio para alterar completamente su actividad, especialmente ablando su actividad en la división del plasminógeno para generar plasmina.

D3 describe la modificación del polipéptido MTSP-1 para que corte la proteína del complemento; MTSP-1 es una proteasa inespecífica, muy parecida a la tripsina. D3 no describe ningún polipéptido u-PA modificado, ni ningún polipéptido modificado de u-PA con mayor actividad y especificidad para C3. D3 concluye que la combinación de

modificaciones en K224/Y146 de MTSP-1 es importante para lograr la escisión de C3 por MTSP-1. Las reivindicaciones de la presente invención se dirigen a una enzima diferente y esta combinación de modificaciones no está presente en ningún polipéptido descrito en la solicitud actual. Modificar aminoácidos específicos en u-PA es como modificar o remodelar dientes individuales en una llave: las modificaciones pueden mejorar o afinar cómo la llave abre la cerradura original (como las modificaciones descritas en D1) o pueden transformar la llave en una llave con la capacidad de abrir una cerradura completamente diferente. D1 no enseña ni sugiere las modificaciones necesarias para que la PA tenga especificidad y actividad de escote para C3, D3 no cura esta deficiencia.

El solicitante no podría haber llegado al tema reclamado al instante combinando las enseñanzas de D1 y D3 sin ejercer habilidad inventiva. Los límites de las reivindicaciones son claros y definitivos porque solo modificaciones específicas de aminoácidos pueden proporcionar la actividad modificada de u-PA—actividad y especificidad para la escisión de C3. Estas modificaciones específicas y sus efectos no son enseñados ni sugeridos por D1 o D3 por sí solos ni en ninguna combinación. Los conjuntos de modificaciones que proporcionan estos efectos solo pudieron descubrirse mediante trabajos experimentales realizados por los inventores durante los siguientes 10-12 años tras el trabajo descrito en D3. Estos experimentos para clonar, extraer y seleccionar polipéptidos u-PA modificados que cortan C3 se describen en la solicitud inmediata en el Ejemplo 1 a partir de la página 209, línea 24 de la descripción. Estos experimentos y los polipéptidos modificados resultantes no se describen ni identifican en D1 o D3 solos o en combinación. Las modificaciones que proporcionan la escisión de C3 se identifican en la solicitud instantánea y sus efectos, tanto individual como colectivamente, se demuestran ampliamente en la solicitud. Las reivindicaciones enumeran SEQ ID NOs específicos de u-Pa modificados que transmiten el efecto técnico de la actividad y la especificidad para la escisión de la proteína C3 del complemento.

El examinador proporciona una tabla comparativa entre el objeto reclamado y los documentos encontrados en el estado del arte y afirma que D1 es el arte más cercano, ya que revela una u-PA modificada que comprende una o más modificaciones de aminoácidos que aumentan **la especificidad de la fibrina** en comparación con la u-PA de tipo silvestre.

La tabla proporcionada por el examinador muestra frases similares que pueden encontrarse entre las reivindicaciones de la solicitud actual y las reivindicaciones en D1 y D3. Se omiten los detalles distintivos, como modificaciones, y el contexto. El solicitante ha reproducido la tabla a continuación y añade la discusión y características distintivas entre las reclamaciones y divulgaciones actuales de D1 y D3. En particular,

ni **D1** ni **D3** revelan ni sugieren ninguna de las modificaciones reclamadas ni sugieren que dichas modificaciones resulten en una división de C3:

Características de la materia reclamada instantáneamente según se indica en la acción	D1	D3
Una proteína de fusión que comprende un polipéptido u-PA modificado de	Un polipéptido activador de plasminógeno tipo uroquinasa modificado (u-PA), que comprende (Reivindicaciones 1 a 4).	Una proteína de fusión que comprende (reivindicación 134)
Un polipéptido activador de plasminógeno tipo uroquinasa modificado (u-PA), que comprende		Un polipéptido proteasa que podría ser un polipéptido activador de plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA) (Reivindicación 12).
Observaciones del solicitante — D1 está dirigido a modificar la actividad de u-PA para su sustrato nativo; La D1 se dirige a una enzima diferente y a distintas modificaciones	El examinador señala frases similares entre las reivindicaciones actuales y D1 a D3 para indicar que todos revelan una u-PA modificada. Modificar simplemente el polipéptido no es una invención. El polipéptido u-PA es completamente diferente del MTSP-1 y está modificado para reconocer y escindir un nuevo sustrato, la proteína del complemento C3. Las secuencias de los dominios proteasas que incluyen las modificaciones están definidas por los SEQ ID NOs enumerados en las reivindicaciones actuales. Los conjuntos específicos de modificaciones que proporcionan esta característica debían descubrirse experimentalmente mediante el proceso descrito en el Ejemplo 1 de la solicitud (véase, página 209, línea 24). El proceso para identificar tales modificaciones, ni las modificaciones, ni sus efectos (desarrollo de un polipéptido u-PA que puede cortar C3, un sustrato novedoso), no se enseña ni sugiere en D1 o D3 por separado o en	

	combinación. Los polipéptidos u-PA modificados recitados en las reivindicaciones actuales tuvieron que ser descubiertos mediante los experimentos descritos en la solicitud actual; son novedosos y poco evidentes respecto al arte anterior.	
Modificaciones a un polipéptido u-PA no modificado	una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas entre modificaciones correspondientes a L420A, L420E, S421G, S421E, P422A, P422G, P422E, F423A o F423E (Reivindicación 9). Las modificaciones también pueden seleccionarse entre R275E, F305H o A292S (Reivindicación 4).	
Observaciones del solicitante – las modificaciones en D1 tienen un propósito completamente diferente y no se parecen ni sugieren modificaciones para alterar la especificidad/actividad del sustrato de u-PA	Las modificaciones en los polipéptidos recitados en las reivindicaciones actuales y las mencionadas en D1 son modificaciones completamente diferentes y logran efectos técnicos totalmente distintos. D1 no menciona ninguna de las modificaciones de V41 ni las mencionadas combinaciones de modificaciones de aminoácidos, que incluyen modificaciones como R35, H37, Y40, D10a, L97b, T97a o H99 como residuo para aumentar la actividad y/o especificidad de C3. Las modificaciones de D1 cumplen una función completamente diferente y proporcionan una característica funcional totalmente distinta a las modificaciones reclamadas al instante. Las modificaciones de D1 mejoran la actividad nativa de u-PA y la especificidad de plasminógeno para mejorar el tratamiento del ictus. En contraste, las	

	modificaciones reclamadas al instante proporcionan una mayor actividad y especificidad para la escisión de C3 y la ablación de su reconocimiento de su sustrato nativo; esto se demuestra en la solicitud para los NO de ID SEQ que comprenden combinaciones de modificaciones, y los efectos técnicos de cada uno de R35Q, H37Y, R37aE, V38E, T39Y, V41R, D10aP, Y60bQ, T97aI, L97bA, H99Q y Y149R se analizan en el Ejemplo 13 de la descripción actual.	
En el que: los residuos se numeran mediante la numeración de quimotripsina	Tiene uno o más aminoácidos modificados (Reivindicaciones 3 y 4).	Los residuos están numerados por numeración de quimotripsina (Reivindicación 19).
Observaciones del solicitante – La numeración de la quimotripsina es estándar en el arte de las proteasas serinas	La numeración de la quimotripsina no es una característica técnica distintiva, sino un sistema para proporcionar claridad y estandarizar la referencia sobre qué aminoácidos se están modificando en la secuencia u-PA. La numeración de la quimotripsina es un sistema estándar de numeración de residuos que se utiliza en varias proteasas serinas de la familia de la quimotripsina, donde los residuos catalíticos clave siempre se identifican con los mismos números. Este sistema de numeración ayuda a proporcionar un sistema de numeración consistente entre las proteasas de serina, incluso cuando presentan diferencias en secuencias de aminoácidos o longitud. La numeración de la quimotripsina se describe en las reivindicaciones para proporcionar claridad en la referencia a residuos específicos de aminoácidos. La Tabla 1 de la descripción muestra los números correspondientes de quimotripsina entre los residuos y números de residuos de polipéptidos u-	

			PA y los números de quimotripsina. El solicitante reitera que las modificaciones mencionadas en las reclamaciones actuales, independientemente del sistema de numeración, no son enseñadas ni sugeridas ni por D1 ni por D3.
el polipéptido u-PA no modificado consiste en la secuencia establecida en cualquiera de los SEQ ID NO 1-6, o el polipéptido u-PA no modificado consiste en una porción del polipéptido de SEQ ID NO: 1, 3, 4 y 6 que contiene el dominio proteasa establecido en el SEQ ID NO: 2 o 5;	El polipéptido u-PA modificado comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 o 2 (Figs. 9 y 10).		
Observaciones del solicitante	La referencia al SEQ ID NO del u-PA no modificado en el que se hacen modificaciones se incluyó en las reivindicaciones para proporcionar claridad. Especificaba el polipéptido inicial en el que se realizaban modificaciones para definir claramente qué se estaba modificando. No obstante, para abordar los rechazos de los examinadores, se ha eliminado de las reivindicaciones las referencias a las SEQ ID NO de los polipéptidos no modificados en los que se han realizado las modificaciones.		
las modificaciones en el polipéptido modificado consisten en F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K, por numeración de quimotripsina,	El polipéptido modificado tiene al menos una modificación de aminoácido (Reivindicaciones 4 y 9).	El polipéptido modificado comprende una o más sustituciones en comparación con un polipéptido no modificado (Reivindicación 49).	
	Las modificaciones conservadoras se seleccionan de N194 y		

	H140 (Párrafo [0041]).	
Observaciones del solicitante	Los polipéptidos u-PA modificados con las modificaciones tal y como se describen en las reivindicaciones actuales no son enseñados ni sugeridos por D1 o D3 solos o en combinación. La solicitud instantánea contiene datos para más de 900 polipéptidos con diversas combinaciones de modificaciones. La solicitud muestra que el u-PA sin modificar no corta C3; la actividad de escisión para C3 se realiza mediante combinaciones específicas de modificaciones, ninguna de las cuales es enseñada ni sugerida por D1 o D3.	
es decir, se fusiona con un polipéptido no proteasa o una parte de este	No menciona	donde el polipéptido que puede usarse en proteínas de fusión incluye polipéptidos GST (glutación S-transferasa), dominios Fc de inmunoglobulina G o una secuencia de señal heteróloga (Reivindicación 134, sección 4).
Observaciones del solicitante	D1 no revela polipéptidos de fusión u-PA, D3 puede describir diversas proteínas de fusión, sin embargo, D3 no revela, enseña ni sugiere polipéptidos u-PA modificados que comprendan las modificaciones tal y como se mencionan en las reivindicaciones actuales. D3 se dirige a polipéptidos MTSP-1 modificados. Las reivindicaciones actuales requieren que la u-PA modificada comprende conjuntos específicos de modificaciones para que la u-PA tenga la novedosa característica técnica de la actividad de escisión para la proteína C3 del complemento. El solicitante no ha inventado la modificación de	

	polipéptidos con polímeros ni la formación de proteínas de fusión; El solicitante ha inventado polipéptidos u-PA modificados, que contienen las modificaciones de aminoácidos listadas en la reivindicación 1 en el dominio proteasa que aumentan la actividad y/o especificidad para la escisión de la proteína del complemento C3. Así, dado que los u-PA modificados no son enseñados ni sugeridos por D1 o D3, las proteínas de fusión que comprenden tales polipéptidos modificados no pudieron ser necesariamente enseñadas ni sugeridas.
--	--

El solicitante reitera argumentos previos que ilustran que las reivindicaciones actuales son inventivas respecto a los elementos de la técnica **previa D1 y D3**. La reivindicación 1 requiere que el polipéptido modificado comprende las modificaciones de las SEQ ID NO mencionados. Las cadenas de modificaciones y sus efectos sobre la actividad y/o especificidad de la proteína del complemento C3 se demuestran en la solicitud instantánea. Cada uno de los SEQ ID NO mencionados en las reivindicaciones se demuestra en la descripción que tiene una mayor actividad y/o especificidad para la escisión de la proteína del complemento C3; las modificaciones adicionales recogidas en las reivindicaciones dependientes mantienen la actividad de escisión para C3. Ni **D1** ni **D3** enseñan ni sugieren los polipéptidos afirmados en esta solicitud ni sus efectos; pérdida de actividad nativa para plasminógeno y ganancia de actividad de escisión de C3.

D1 enseña variantes de la uroquinasa que se modifican para tener una mayor especificidad para la fibrina, en comparación con el fibrinógeno, lo que hace que la u-PA no sea neurotóxica para el tratamiento del ictus y no para la escisión de C3 o la inhibición de la actividad del complemento. La discusión anterior detalla en detalle que D1 no enseña ni sugiere una u-PA modificada que tenga actividad y/o especificidad para que C3 se trabaje para inhibir el complemento. No hay enseñanza ni sugerencia en D1 de una u-PA modificada que comprenda V41R, ni ninguna de las combinaciones de modificaciones en las SEQ ID NOs recitados, ni una u-PA modificada que tenga actividad y/o especificidad para la proteína del complemento C3. Tal como se ha enmendado, las reivindicaciones recitan las secuencias de los dominios proteasas (la única parte modificada de u-PA) para la escisión de C3. No se necesita trabajo experimental adicional para preparar polipéptidos u-PA modificados.

D3 es citado por su enseñanza que habría sido obvio que alguien con habilidad en el arte incluyera una sustitución en el aminoácido 41, como sugiere D3 en los polipéptidos de D1. Esto carece de fundamento: D3 se dirige a otra proteasa, MTSP-1, y D3 concluye que para la escisión de C3 la combinación de modificaciones en K224/Y146 es importante, **no en el residuo 41**. Así que, incluso si los resultados para otra proteasa fueran relevantes, la conclusión es que K224/Y146 son los residuos importantes para la escisión de C3. Nadie que leyera D3 podía o quisiera seleccionar V41R como sustituto en u-PA.

La modificación en la posición 41 ejemplificada en D3 es una modificación de MTSP-1, no u-PA. D3 enseña o sugiere cualquiera de las combinaciones de modificaciones mencionadas en las reivindicaciones, ni los polipéptidos u-PA modificados reclamados. D1 y D3, individualmente o en combinación, no enseñan ni sugirieron los alegados polipéptidos modificados de u-PA, sus modificaciones específicas de aminoácidos y combinaciones de modificaciones, ni sus efectos técnicos de actividad de corte para C3.

Ni D1 ni D3 enseñan ni sugieren la modificación V41R, ni ninguna de las modificaciones de combinaciones mencionadas en las reivindicaciones, ni ninguna modificación que aumente la actividad y/o 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 a las variantes de la uroquinasa una mayor especificidad para la fibrina, en comparación con el fibrinógeno, para así aumentar la escisión del plasminógeno y disminuir la neurotoxicidad, para su uso en el tratamiento del ictus. D1 no enseña ni sugiere ningún reemplazo de u-PA en ninguna de las posiciones mencionadas, ni enseña ni sugiere ningún polipéptido u-PA modificado que no corte el sustrato nativo y por tanto no tenga utilidad para tratar el ictus, ni uno que tenga mayor actividad y/o especificidad para C3. D3 está dirigida a modificar proteasas no complementarias para aumentar la especificidad o actividad de un sustrato objetivo seleccionado para inhibir el complemento, pero no proporciona u-PA modificada para este propósito. En los ejemplos de D3, se genera y analiza un panel de polipéptidos MTSP-1 modificados para inhibir el complemento según la evaluación 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 ninguna modificación a polipéptidos u-PA en ese residuo. MTSP-1 es una enzima completamente diferente de la u-PA. Por tanto, la combinación de D1 y D3 no puede enseñar ni sugerir los polipéptidos u-PA modificados reclamados instantáneamente que

incluyen las combinaciones de modificaciones recitadas.

Los datos de la solicitud instantánea (algunos reproducidos en las tablas anteriores) muestran muchos ejemplos de polipéptidos u-PA modificados que cortan e inactivan el C3. Los polipéptidos que comprenden cada uno de los polipéptidos referenciados por SEQ ID en la reivindicación 1 tienen datos experimentales que demuestran al menos su aumento de actividad para C3. El Ejemplo 13, por ejemplo, demuestra el efecto de cada R35Q, H37Y, V41R, R35Q, H37Y, D60aP, L97bA, T97aI y H99Q, que se incluyen entre las combinaciones de modificaciones listadas en la reivindicación 1, sobre la escisión C3. Como se muestra en el Ejemplo 13, V41R incrementa 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 listadas en las reivindicaciones de proteína C3 del complemento de escisión, y lo hacen con mayor actividad y/o especificidad que la u-PA no modificada. El u-PA no modificado (*por ejemplo*, SEQ ID NO:5) no divide específicamente C3. No hay incertidumbre ni imprevisibilidad en los datos presentados en la solicitud; los datos muestran que el u-PA puede modificarse para cortar C3. Los datos también muestran una reducción o eliminación en la capacidad de escindir la plasmina, el sustrato nativo. Ninguna de las referencias citadas enseña ni sugiere estas modificaciones, ni que un polipéptido u-PA modificado con cualquiera de estas modificaciones tenga una actividad anti-C3 aumentada en comparación con un polipéptido u-PA no modificado.

Ni D1 ni D3 enseñan ni sugieren ninguno de los reemplazos recitados, ni los sustitutos conservadores de los mismos, ni ninguna de las combinaciones de modificaciones mencionadas, ni las propiedades de los polipéptidos u-PA modificados que se logran mediante ellos, como se ha discutido anteriormente. No existe ninguna referencia que sugiera un reemplazo en V41R, ni ninguna de las modificaciones de combinaciones mencionadas en las reivindicaciones, en un polipéptido u-PA para alterar la actividad/especificidad de la escisión C3 y así resultar en un polipéptido que inhiba la vía del complemento. Así, la modificación V41R, las cadenas de modificaciones como se enumeran en la reivindicación 1 y sus modificaciones conservadoras son poco evidentes sobre D1 y D3, por separado o en cualquier combinación.

Cabe señalar que el número de acceso de Uniprot A0A2R9BBQ2, la forma madura del *chimpancé pigmeo silvestre (Bonobo)* u-PA, que incluye una L en el residuo 41, no ofrece ninguna enseñanza ni sugerencia, sola o en combinación con D1 y/o D3, que resulte en ninguno de los polipéptidos reclamados instantáneamente, todos los cuales escinden C3, no plasminógeno. Esto demuestra aún más la importancia de la V41R en la alteración de la actividad de la u-PA, ya que Bonobo u-Pa, que contiene V41L, funciona como enzima u-PA. La secuencia Uniprot sola o en cualquier combinación con

cualquiera de las referencias adicionales D1, D3 o cualquier otra referencia registrada, no enseña ni sugiere una u-PA modificada que tenga ninguna de las modificaciones y la actividad o especificidad aumentadas para una proteína del complemento que sea C3. La entrada de Uniprot no aporta nada a las enseñanzas de ninguna referencia registrada en la solicitud. No existe una combinación de enseñanzas que resulte en un polipéptido u-PA modificado que comprenda solo V41R, ni en combinaciones de otras modificaciones como se menciona en las reivindicaciones.

Efecto técnico de los polipéptidos reclamados instantáneamente

Los polipéptidos u-PA modificados reivindicados en la presente solicitud presentan actividad y especificidad para la escisión de la proteína del complemento C3, junto con una actividad sustancialmente reducida o nula frente a su sustrato nativo, el plasminógeno. Este efecto técnico está claramente demostrado por los datos experimentales contenidos en la solicitud. En particular, los ejemplos de trabajo muestran que los polipéptidos u-PA modificados que comprenden las modificaciones recitadas en las reivindicaciones, incluida la sustitución V41R, escinden eficazmente la proteína del complemento C3, exhibiendo una actividad y/o especificidad significativamente superior a la de u-PA no modificada.

En contraste, la u-PA no modificada (por ejemplo, el polipéptido del SEQ ID NO:5) no escinde C3 de manera específica. Por ejemplo, el Ejemplo 13, tabla 23 (reproducido más abajo), cuantifica la escisión, la proteína complementaria del sustrato C3 para el polipéptido u-PA no modificado (SEQ ID NO:5) y para los polipéptidos u-PA modificados SEQ ID NOs:21-33, de modo identificar los efectos técnicos de cada uno de R35Q, H37Y, R37aE, V38E, T39Y, **V41R**, D10aP, Y60bQ, T97aI, L97bA, H99Q y Y149R. El ejemplo 13 demuestra específicamente que **V41R incrementa la actividad intrínseca del anti-C3 y la actividad anti-C3 en el 80% del plasma humano en aproximadamente 25 - 27 veces.**

Tabla 23: Propiedades ejemplares de polipéptidos u-PA modificados

SEQ ID NO:	Mutación por numeración de la quimotripsina													Actividad C3 (%) en el día 7		
	R35	H37	R37a	V38	T39	V41	D60a	Y60b	T97a	L97b	H99	C122	Y149	Escisión hC3 (nM)	Vítreo	PBS
5	R	H	R	V	T	V	D	Y	T	L	H	S	Y	3380	102	111
21	Q	Y	E	E	Y	R	P	Q	I	A	Q	S	R	19	83	94
22	R	Y	E	E	Y	R	P	Q	I	A	Q	S	R	51	73	79
23	Q	H	E	E	Y	R	P	Q	I	A	Q	S	R	46	88	92
24	Q	Y	R	E	Y	R	P	Q	I	A	Q	S	R	6	87	99
25	Q	Y	E	V	Y	R	P	Q	I	A	Q	S	R	10	105	103
26	Q	Y	E	E	T	R	P	Q	I	A	Q	S	R	161	93	108
27	Q	Y	E	E	Y	V	P	Q	I	A	Q	S	R	519	88	100
28	Q	Y	E	E	Y	R	D	Q	I	A	Q	S	R	30	93	97
29	Q	Y	E	E	Y	R	P	Y	I	A	Q	S	R	11	58	61
30	Q	Y	E	E	Y	R	P	Q	T	A	Q	S	R	25	86	92
31	Q	Y	E	E	Y	R	P	Q	I	L	Q	S	R	155	90	111
32	Q	Y	E	E	Y	R	P	Q	I	A	H	S	R	92	89	108
33	Q	Y	E	E	Y	R	P	Q	I	A	Q	S	Y	9	74	99

Los datos presentados en el Ejemplo 13 de la descripción evalúan de manera sistemática la contribución individual de cada modificación de aminoácido a la actividad de escisión de C3 y a otras propiedades del polipéptido. En dicho ejemplo se desconvoluciona el efecto de cada modificación sobre la actividad de escisión de C3 mediante un enfoque comparativo, en el que cada modificación se revierte individualmente al residuo de tipo silvestre. La actividad de escisión del polipéptido así obtenido se evalúa y se compara con la del polipéptido u-PA modificado que contiene el conjunto completo de las 13 modificaciones, tal como se define en el SEQ ID NO:21.

Todas las modificaciones (SEQ ID NO: 21) dan lugar a un polipéptido con alta actividad de escisión en C3. El **polipéptido u-PA modificado de SEQ ID NO 21 tiene un ED_{50} para la escisión de C3 de 19 nM, frente a 3380 nM para u-PA no modificado**. Cada polipéptido adicional analizado elimina una de las 13 modificaciones y la actividad se

compara con el polipéptido con todas las modificaciones para determinar la contribución de cada modificación a la reducción de ED_{50} de todos los reemplazos. El cambio en la actividad refleja la contribución de cada una de las modificaciones a la actividad de la escisión (u otras propiedades del polipéptido u-PA modificado); Esto proporciona una evaluación precisa del efecto de cada modificación sobre la actividad de la escisión.

La solicitud contiene datos para más de 900 polipéptidos modificados de u-PA. Todos reconocen el sitio de escisión en C3 porque todos fueron aislados mediante un ensayo que captura polipéptidos y reconocen este sitio. La mayoría de los 900 polipéptidos escinden C3 con alta actividad. La solicitud muestra que la u-PA sin modificar **no** escinde C3. Todos los polipéptidos reclamados **sí** escinden C3, demostrando así un efecto técnico de los polipéptidos reclamados.

Más de 400 polipéptidos u-PA modificados ejemplares con un EC_{50} inferior a 100 nM para la escisión de C3 que contienen las modificaciones se enumeran en la reivindicación 1. Otros tienen un ED_{50} más alto, pero siguen escindiendo C3. Dado que no se consumen enzimas en una reacción, si la ED_{50} tiene 10 nM, 100 nM o más no es de gran importancia para el uso terapéutico, y todas las combinaciones de modificaciones mencionadas en las reivindicaciones (así como las combinaciones descritas en la solicitud) reconocen el sitio de escisión en C3 y no reconocen el sustrato nativo. Así, las reivindicaciones proporcionan terapias que pueden utilizarse para inhibir el complemento mediante la escisión C3.

La solicitud, por tanto, demuestra que u-PA con las combinaciones de modificaciones recitadas escinden C3. La u-PA no modificada no escinde C3, ni tampoco el polipéptido modificado de u-PA de D1. Las modificaciones de U-PA en D1 aumentan la actividad de corte para el *sustrato nativo*. Por tanto, la u-PA modificada de D1 es para tratar el ictus alterando la coagulación, no para inhibir el complemento.

Se evaluaron cientos de polipéptidos u-PA modificados más por su actividad de escisión, incluyendo más de 475, incluyendo u-PA tipo silvestre, sin escisión de hC3 (*véanse, por ejemplo*, las tablas 14, 19 y 20 reproducidas en parte y discutidas anteriormente). El polipéptido u-PA es una proteasa inespecífica; las modificaciones aumentan la especificidad (kcat/km) para C3 (*véase, por ejemplo*, la Tabla 14, reproducida más abajo). La dosis ED_{50} (dosis efectiva) de polipéptidos tipo silvestre y u-PA modificados es la necesaria para escindir el 50% del C3 en el plasma anticoagulado "de prueba". Los polipéptidos u-PA modificados con las modificaciones listadas en la Tabla 14 se comparan con el dominio de la proteasa u-PA silvestre no modificado con la modificación C122S. La modificación C122S se introduce para prevenir la agregación de proteínas y no afecta a la actividad de la u-PA. Los estudios en los Ejemplos de Trabajo comparan los polipéptidos u-PA modificados con el tipo silvestre u-PA.

Las reivindicaciones enumeran polipéptidos que comprenden las combinaciones de modificaciones reclamadas, y la solicitud muestra que todos los polipéptidos reclamados reconocen un sitio de escisión en C3 y escinden e inactivan C3. Como se detalla en la solicitud, el efecto técnico del reemplazo C122S es que reduce la agregación de cadenas simples, especialmente en *experimentos in vitro*, sin alterar 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 y provocar la agregación entre cadenas polipeptídicas individuales. El reemplazo de C por S es una modificación conocida para reducir la agregación de terapias polipeptídicas que contienen una cisteína libre que resulta en 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: reemplazar una cisteína libre que provoca agregación.

Todos los polipéptidos u-PA modificados reivindicados se seleccionan y diseñan para reconocer y escindir un sitio diana en una proteína del complemento, en particular C3, con el fin de inactivarla, y se evalúan adicionalmente para presentar actividad y/o especificidad reducida frente a sustratos fisiológicos in vivo, como el plasminógeno. Los polipéptidos comprendidos en el alcance de las reivindicaciones pueden seleccionarse e identificarse mediante cualquier método de cribado proteásico adecuado. En la presente solicitud, los polipéptidos u-PA modificados se identificaron inicialmente mediante el método de cribado descrito en la Patente de EE. UU. n.º 8.211.428, en el que una biblioteca de proteasas modificadas se pone en contacto con una serpina modificada que incorpora una secuencia diana en el bucle del sitio reactivo, permitiendo capturar aquellas proteasas capaces de escindir dicho objetivo. Las combinaciones de modificaciones reivindicadas y su actividad de escisión frente a C3 se muestran en la Tabla 14.

Todos los polipéptidos u-PA modificados según se afirman tienen actividad para escindir C3. Los ejemplos 4 y 5, que incluyen las tablas 16 y 17, detallan, respectivamente, la escisión y estabilidad de varios polipéptidos u-PA modificados en el humor vítreo. Es bien sabido por los expertos en el arte cómo seleccionar modificaciones y combinaciones de modificaciones que puedan transmitir estos y otros efectos técnicos deseables. Además, la solicitud detalla los protocolos experimentales que una persona experta en el arte podría realizar para cuantificar y evaluar la estabilidad y actividad de un polipéptido en el humor vítreo que incluya cualquier otra modificación seleccionada.

En vista de las observaciones y enmiendas anteriores, las reivindicaciones inventivas 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 D2. 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 solicitud al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional.

10. Anexos

- Nuevo capítulo reivindicatorio conformado por cuarenta y cinco (45) reivindicaciones.
- Recibo de pago por concepto de modificaciones a las reivindicaciones.

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 u-PA modificado comprende la secuencia de residuos de aminoácidos establecida en cualquiera de la SEQ ID NO: 8-14, 18-21, 23-25, 28-30, 32,33, 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, 534, 543, 550-552, 557, 561, 562, 584, 586, 595, 597, 601, 604, 608, 611-621, 623, 624, 627, 628, 633, 645, 647, 648, 650, 653, 656-658, 663-671, 673, 675-690, 693, 694, 696, 697, 701-708, 710, 712-715, 717, 718, 720, 722, 724, 726-729, 731-738, 740-744, 746, 748-754, 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, 986, 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 las modificaciones consisten en modificaciones de aminoácidos que corresponden a Y40Q/V41R/L97bA/C122S o Y40Q/V41R/L97bA o R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R o R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R.

3. El polipéptido de u-PA modificado de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el polipéptido u-PA modificado comprende la secuencia de residuos de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 21 y 18, y cualquiera de estos polipéptidos en los cuales C122S no está modificado y permanece como C122C, según la numeración de quimotripsina.

4. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 1, en donde el polipéptido u-PA modificado comprende la secuencia de residuos de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 18, 21, 23, 24, 25, 28-30, 32, 33, 733-738, 740-742, 744, 746 y 749.

P-2021/16671

Reivindicaciones Modificadas en respuesta a Oficio No. 16334

February 6, 2026

5. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 1, en donde cada polipéptido de u-PA modificado comprende la secuencia de residuos de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 21 o 987.

6. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el polipéptido de u-PA modificado comprende la secuencia de residuos de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 18.

7. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que se conjuga con otra porción o polímero, ya sea directamente o mediante un ligador.

8. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 7 que es una proteína de fusión.

9. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 7 que está PEGilado.

10. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 que comprende un polímero que incrementa la semivida en suero y/o para reducir la inmunogenicidad o ambas.

11 El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 10, en donde el polímero comprende un polipéptido seleccionado entre poli-D,L-aminoácidos y la albúmina sérica humana (HSA).

12. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 11, en donde la HSA que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 991.

13. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 10, en donde la porción es un dominio de multimerización que es un dominio Fc; en donde el dominio Fc comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 50 o SEQ ID NO: 992.

14. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el polímero o porción se enlaza directamente al polipéptido de u-PA modificado.

15. El polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el polímero o porción se enlaza mediante un ligador peptídico al polipéptido de u-PA modificado.

16. El polipéptido de u-PA modificado de la reivindicación 15, en donde el ligador comprende Gly y/o Ser, en donde el ligador contiene hasta 20, 30, 40 o 50 residuos de aminoácidos, y en donde el ligador comprende (GS) n o (G) n (S) n o (GGS) n o (SGG) n o (GGSSGG) n o (AGS) n , en donde n es 1 a 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 o un ligador que contiene hasta 25 residuos que contienen una o más de S, G, E y K.

17. El polipéptido u-PA modificado de la reivindicación 16, que comprende la secuencia de residuos de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1001-1003, y 1024-1029 y múltiplos de las mismas.

18. Una proteína de fusión, que comprende un polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-17 que se fusiona a un polipéptido de no proteasa o una porción del mismo.

19. La proteína de fusión de la reivindicación 18, en donde el polipéptido de no proteasa es un dominio de multimerización o un dominio de transducción de proteína (PTD) o un dominio de multimerización que es un dominio Fc.

20. La proteína de fusión de la reivindicación 18 que comprende una secuencia de activación de furina,

en donde el sitio de activación de furina comprende QSGQKTLRRRK (SEQ ID NO: 996) o QCGQKTLRRRK (SEQ ID NO: 995) o QSGQKTLRRRK (SEQ ID NO: 1044).

21. Una proteína de fusión, que comprende un polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde la proteína de fusión comprende una secuencia de señal y el polipéptido de u-PA modificado, en donde la secuencia de señal es seleccionada de entre Il-2 y u-PA.

22. La proteína de fusión de la reivindicación 18, en donde el polipéptido de no proteasa o la porción del mismo 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).

23. La proteína de fusión de la reivindicación 22, en donde el polipéptido de no proteasa o la porción del mismo es un HABD que es gen 6 estimulado por factor de necrosis tumoral (TSG-6).

24. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, que comprende una secuencia de activación.

25. La proteína de fusión de la reivindicación 24, 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.

26. La proteína de fusión de la reivindicación 24, en donde la secuencia de activación es una secuencia de activación de u-PA o una secuencia de activación de furina, en donde la secuencia de activación tiene la secuencia expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 995-998, 1041 y 1044.

27. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 18-26, que comprende una secuencia de activación, un polipéptido de u-PA modificado y HSA.

28. Una proteína de fusión de la reivindicación 18, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1004-1019 y 1034-1040.

29. Una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 18-28 que es una forma activada de dos cadenas que contiene una cadena A y una cadena B.

30. La proteína de fusión de la reivindicación 29, 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.

31. La proteína de fusión de la reivindicación 30, 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.

32. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 18-31 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; o una cadena A de los residuos 21-178 y una cadena B de los residuos 179 hasta el extremo C-terminal de la proteína, con un enlace disulfuro entre los residuos 168-299.

33. 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 1-32.

34. Un vector, que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 33, en donde el vector se selecciona de entre un vector procariota o un vector eucariota, o un vector viral o un vector de levadura.

35. El vector de la reivindicación 34 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.

36. Una célula recombinante aislada o un cultivo celular, que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 33 o el vector de cualquiera de las reivindicaciones 34 y 35, en donde la célula aislada no es una célula vegetal ni un cigoto humano ni una célula embrionaria.

37. Un kit, que comprende dos composiciones que incluyen:

(a) un polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-17 o una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 18-32; y

(b) un segundo agente o agentes, en donde se selecciona de entre antiinflamatorios o anticoagulantes 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

P-2021/16671

Reivindicaciones Modificadas en respuesta a Oficio No. 16334

February 6, 2026

(gamma), inhibidor de complemento, heparina, warfarina, acenocumarol, fenindiona, EDTA, citrato, oxalato, argatroban, lepirudina, bivalirudina y ximelagatrán.

38. La combinación del polipeptido u-PA modificado o la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-37, en donde el polipéptido de u-PA modificado comprende la modificación seleccionada de entre V41R y V38E/V41R.

39. 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 1-17 o una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 18-32 en una célula *in vitro*, en donde la célula es una célula no embrionaria;

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

y

aislar el polipéptido expresado.

40. El método de la reivindicación 39, en donde la célula es una célula eucariota.

41. El método de la reivindicación 40, en donde la célula es una célula de mamífero o una célula de levadura.

42. Una composición farmacéutica, que comprende un polipéptido de u-PA modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-17 o una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 18-32 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

43. La composición farmacéutica de la reivindicación 42, en donde el polipéptido de u-PA modificado o proteína de fusión está en una forma activada de dos cadenas.

44. La composición farmacéutica de la reivindicación 42 o reivindicación 43, 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.

45. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones

P-2021/16671

Reivindicaciones Modificadas en respuesta a Oficio No. 16334

February 6, 2026

42-44, en donde el polipéptido de u-PA modificado o proteína de fusión comprende el polipeptido u-PA modificado expuesta en la 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: 26-226990

Fecha: 06/02/2026

CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO

CC: 66.783.790

Pago PSE No: 1221236

CUS: 42846716

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	\$ 236,500	\$ 236,500
TOTAL					\$ 236,500