

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 166**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/075** (2006.01)

**C07K 14/725** (2006.01)

**A61K 38/16** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**C12N 15/63** (2006.01)

**A61P 37/02** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2010 E 10764877 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 2414385**

54 Título: **Composiciones y métodos para modular la actividad de proteínas reguladoras del complemento sobre células diana**

30 Prioridad:

**27.10.2009 US 255450 P**

**31.03.2009 US 165434 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.08.2015**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF WASHINGTON (50.0%)**  
**4311 - 11th Avenue NE, Suite 500 Campus Box**  
**354990**

**Seattle, WA 98105-4608, US y**  
**COMPLIMENT CORPORATION (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LIEBER, ANDRE;**  
**WANG, HONGJIE;**  
**BERENSON, RONALD JAY y**  
**CARTER, DARRICK**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 543 166 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## Composiciones y métodos para modular la actividad de proteínas reguladoras del complemento sobre células diana

### Descripción

5 ANTECEDENTES

10 El sistema del complemento es el principal efector del aspecto humoral del sistema inmunitario. La vía clásica de activación del complemento implica la unión de componentes solubles, tales como ciertas clases y subclases de anticuerpos, a dianas de antígeno dentro del cuerpo. Los cambios conformacionales en las regiones Fc de estos anticuerpos unidos exponen sitios de unión para C1, un componente soluble del sistema del complemento en su estado inactivo. Tras la unión estable, C1 experimenta cambios conformacionales que producen actividad de proteasa activa en uno de los subcomponentes de C1. La actividad de proteasa inicia una cascada de interacciones altamente reguladas entre los componentes del complemento. Un resultado de la cascada es el ensamblaje de un complejo de ataque de la membrana (**MAC**) sobre células diana.

20 Una etapa importante en la cascada de interacciones de la activación del complemento es la etapa de convertir el componente C3 en C3b activo debido a que hay enorme amplificación de la señal de activación durante esta etapa. Particularmente, una convertasa C3 individual puede convertir cientos de moléculas de C3 en C3b. Cada componente de C3b, a su vez, forma parte de una convertasa C5, produciendo C5b. Cada molécula de C5b activada inicia la formación del MAC. El MAC es una estructura macromolecular que penetra a través de la membrana celular para crear un poro transmembranario. El poro rompe la integridad de la membrana y permite que iones y moléculas pequeñas difundan libremente a su través, conduciendo a la citólisis dependiente del complemento (CDC).

25 Los anticuerpos monoclonales (**mAb**) han surgido como una clase potencialmente poderosa de novedosos agentes terapéuticos para varias enfermedades. Por ejemplo, en el campo de la oncología, hay varios mAb terapéuticos comercializados para el tratamiento de cáncer, y hay cientos de mAb actualmente en desarrollo clínico (véase J. Castillo, et al., *Experimental Hematology* 36:755-768 (2008)). Muchos de estos mAb terapéuticos operan activando la cascada del complemento que conduce al ensamblaje de MAC sobre células tumorales transformadas, causando CDC. Este enfoque terapéutico puede ser ventajoso debido a que los anticuerpos pueden ser específicamente dirigidos hacia antígenos que son específicos para células tumorales transformadas, evitando así muchos efectos secundarios resultantes de los tratamientos existentes.

35 Sin embargo, el potencial terapéutico de los mAb terapéuticos puede limitarse debido a la capacidad de células enfermas para bloquear la destrucción por CDC mediante la expresión de proteínas reguladoras del complemento (**CRP**) de la membrana, tales como CD35, CD46, CD55 y CD59 (D. Gancz y Z. Fishelson, *Molecular Immunology* 46:2794-2800 (2009); J. Golay, et al., *Blood* 98:3383-3389 (2001); K.A. Gelderman et al., *Laboratory Investigation: A Journal of Technical Methods and Pathology* 82:483-493 (2002); y N. Donin et al., *Clinical and Experimental Immunology* 131:254-263 (2003)). CD46 y CD55 bloquean la cascada del complemento en la etapa de activación C3 y CD59 previene el ensamblaje del MAC del complemento (Z. Fishelson et al., *Molecular Immunology* 40:109-123 (2003)).

45 Por tanto, existe la necesidad de composiciones y métodos para reducir la presencia de CD35, CD46, CD55 y CD59 sobre la superficie de células diana con el fin de reducir la inhibición mediada por CRP del MAC del complemento.

### RESUMEN DE LA INVENCION

50 La invención proporciona un polipéptido modificado que puede trimerizar y reducir la actividad, cantidad o densidad de una proteína reguladora del complemento (CRP) sobre una superficie de célula diana, en el que el polipéptido tiene al menos el 90 % de identidad de secuencias con la secuencia de botón de fibra de Ad35 de SEC ID N°: 3 e incluye los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 123-134 de SEC ID N°: 2, o sustituciones conservativas de los mismos, en el que el polipéptido incluye adicionalmente los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 242, 279, 282 y 302 de SEC ID N°: 2, y en el que el polipéptido comprende un primer dominio y un segundo dominio con afinidad de unión por CRP, en el que el primer dominio comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 22, SEC ID N°: 23, SEC ID N°: 24, SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 26, SEC ID N°: 27, SEC ID N°: 28, SEC ID N°: 29, SEC ID N°: 30 o SEC ID N°: 31, y en la que X<sub>1</sub> no es aspartato, X<sub>2</sub> no es treonina o X<sub>3</sub> no es isoleucina.

60 La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona un vector que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido de la invención.

65 La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la invención, en la que dicho polipéptido comprende un polipéptido del dominio de botón de

fibra modificado que comprende al menos 40 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 3.

La invención también proporciona una composición para reducir los niveles en la superficie celular de CD46, que comprende: (a) una cantidad de un agente eficaz para reducir los niveles en la superficie celular de CD46, comprendiendo el agente una pluralidad del polipéptido de la invención, en la que dicho polipéptido comprende a dominio de botón de fibra de adenovirus modificado, en la que el dominio de botón de fibra de adenovirus modificado puede formar homotrimeros que tienen afinidad potenciada por unirse a CD46 en comparación con homotrimeros formados a partir de una pluralidad de polipéptidos que consiste en SEC ID N°: 3, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona un kit que comprende: (a) el polipéptido de la invención; y (b) un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a un antígeno sobre la superficie de una célula de mamífero e induce citólisis dependiente del complemento.

La invención también proporciona un agente que comprende una pluralidad de polipéptidos del dominio de botón de fibra de adenovirus modificados de la invención, para su uso en un método de potenciar el efecto de un agente terapéutico de anticuerpo en el tratamiento de cáncer, comprendiendo el método: (a) administrar al menos una vez al sujeto mamífero una cantidad del agente que comprende una pluralidad de polipéptidos del dominio de botón de fibra de adenovirus modificados de la invención y que comprende fenilalanina (Phe) en la posición 242, arginina (Arg) en la posición 279, serina (Ser) en la posición 282 y ácido glutámico (Glu) en la posición 302, eficaz para reducir la cantidad de CD46 presente sobre la superficie de una célula diana; y (b) administrar al menos una vez una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico de anticuerpo al sujeto, en el que el agente terapéutico de anticuerpo se une a un antígeno de superficie de células no CD46 expresado sobre la célula diana.

## RESUMEN DE LA DESCRIPCIÓN

Este resumen se proporciona para introducir una selección de conceptos de una forma simplificada que se describen adicionalmente a continuación en la Descripción detallada. Este resumen no pretende identificar características clave de la materia reivindicada, ni pretende usarse como una ayuda en determinar el alcance de la materia reivindicada.

En el presente documento se describen composiciones y agentes que pueden reducir la actividad, cantidad o densidad de proteínas reguladoras del complemento (CRP) sobre células diana. Adicionalmente se describen métodos de identificación de tales composiciones y agentes, métodos de preparación y usos de los mismos. Adicionalmente se describen métodos de aumentar la susceptibilidad de una célula diana o tejido a una citólisis dependiente del complemento (CDC) mediada por agente terapéutico y el ensamblaje mediado por el agente terapéutico de un complejo de ataque de la membrana (MAC) sobre la célula diana o tejido.

En un aspecto, se describe una composición que comprende un polipéptido modificado que puede reducir la actividad, cantidad o densidad de una proteína reguladora del complemento (CRP) sobre una superficie de célula diana, en la que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que no se produce naturalmente. En una realización, el polipéptido produce la internalización o secuestro de la CRP. En otra realización, el polipéptido se une a la CRP. En ciertas realizaciones, el polipéptido se une a la CRP con una constante de disociación ( $K_d$ ) de 1 nM o menos o el polipéptido se une a la CRP con una constante de disociación ( $K_d$ ) de 0,65 nM o menos. En una realización específica, el polipéptido es una proteína viral aislada. En una realización tal, el polipéptido se deriva de una proteína de botón de fibra adenoviral -- por ejemplo, una proteína de botón de fibra de Ad35. En una realización relacionada, el polipéptido se deriva de la proteína de botón de fibra de Ad35 que comprende al menos una sustitución de aminoácidos en los residuos seleccionados de Asp207, Thr245, Ile256, y una combinación de los mismos. En una realización específica, la sustitución de aminoácidos es Asp207Gly, Thr245Ala, Ile256Leu, o una combinación de los mismos. En otra realización, el polipéptido tiene menos de 25.000 Daltons. En otra realización más, la composición comprende una forma dímera del polipéptido, una forma trímica del polipéptido, o una forma homotrímica del polipéptido. En estas realizaciones, la CRP es una proteína transmembranaria y/o es una proteína ligada a GPI. En realizaciones específicas, la CRP es CD46, CD55, CD59 o CD35. En una realización muy específica, la CRP es CD46. En otra realización específica, el polipéptido se une a CD46. Las composiciones proporcionadas en estas realizaciones son adicionalmente capaces de sensibilizar la célula diana a la citólisis dependiente del complemento mediada por anticuerpo y/o ensamblaje de un complejo de ataque de la membrana. En las realizaciones descritas en el presente documento, la célula diana puede ser una célula tumoral. La célula tumoral puede seleccionarse del grupo que consiste en una célula obtenida de un carcinoma, una célula obtenida de un sarcoma, una célula obtenida de un blastoma, una célula obtenida de un cáncer de células germinativas y una célula obtenida de un tumor hematológico. La célula tumoral también puede seleccionarse del grupo que consiste en células de linfoma primario, células de linfoma de Raji-Burkitt, células BJAB, células Farage, células BT474, células HT1854, células LoVo, células HT29, células Mino, células Jurkat, células K562, células HeLa, células A549, células SKOV3, células HT29 y células MDA235MB. En una realización específica, la célula diana comprende un marcador de la superficie celular para un tumor sólido. El tumor sólido puede ser un tumor de mama, pulmón, sistema colorrectal, estómago, próstata, ovario, útero, cuello uterino, riñón, páncreas, hígado, cerebro, cabeza y cuello, sistema nasofaríngeo o esófago. En otra realización específica, la célula diana comprende un marcador de la

superficie celular para un sarcoma. El sarcoma puede ser leiomioma, fibrosarcoma, rhabdomiomas o sarcoma de Ewing. En otra realización específica, la célula diana comprende un marcador de la superficie celular para un tumor hematológico. Un tumor hematológico puede ser una leucemia, linfoma o mieloma. En una realización más específica, la célula diana es un linfocito B, tanto un linfocito B normal como un linfocito B maligno. Las células diana pueden expresar uno o marcadores celulares seleccionados del grupo que consiste en CD3, CD10, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD30, CD33, CD35, CD37, CD38, CD40, CD44, CD52, CD70, CD80, CD133, CD200, receptor 1 del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico (Her2/neu), glóbulo 1 de grasa de leche humana (HMFG1), receptor de interleucina 2 (IL2R), mucina 1 y factores de crecimiento endoteliales vasculares. En una realización específica, la célula diana expresa CD20. En realizaciones relacionadas, el polipéptido es adicionalmente capaz de aumentar la activación del complemento sobre la superficie de la célula diana y/o el polipéptido es capaz de aumentar el ensamblaje de un complejo de ataque de la membrana (MAC) sobre la superficie de la célula diana. En otras realizaciones relacionadas, el polipéptido puede reducir la actividad, cantidad o densidad de la proteína reguladora del complemento (CRP) al menos el 25 % cuando se compara con el nivel inicial o el polipéptido sin modificar; el polipéptido puede reducir la actividad, cantidad o densidad de la proteína reguladora del complemento (CRP) durante al menos 24 horas; y/o el polipéptido es activo a concentraciones de aproximadamente 25 ng/ml o menos. En otras realizaciones relacionadas, el polipéptido no es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo; el polipéptido no es un factor de crecimiento o una citocina; el polipéptido no se une a una región reguladora de la transcripción de un gen; el polipéptido no se une a una región promotora, región potenciadora, región silenciadora o región aislante de un gen; y/o el polipéptido no se une a un factor de transcripción. En otras realizaciones relacionadas, el polipéptido tiene al menos 120 aminoácidos de longitud; el polipéptido comprende al menos una unión de una proteína que se produce naturalmente o dominio de proteína; el polipéptido comprende al menos el 90 % de homología de secuencias de aminoácidos con una proteína que se produce naturalmente o dominio de proteína; y/o el polipéptido no es una proteína que se produce naturalmente o fragmento de proteína. En todavía otras realizaciones relacionadas, el polipéptido se modifica adicionalmente para reducir la inmunogenicidad. La inmunogenicidad del polipéptido puede reducirse acoplado el polipéptido a un alquil-PEG, por desinmunización de epítopes, co-administrando un agente inmunosupresor, añadiendo una pauta tolerizante, glicosilando el polipéptido, o co-administrando un agente que potencia la activación del complemento. En otra realización, la composición proporcionada en este aspecto comprende un virus modificado o un microorganismo que interacciona con CRP modificado --por ejemplo, una cepa bacteriana de *Neisseria* o estreptocócica. En una realización tal, el virus puede interactuar con la CRP y está seleccionado del grupo que consiste en un adenovirus, un virus adenoasociado, un retrovirus, un virus del herpes, un virus del sarampión (cepa Edmonston), virus del herpes 6 humano, un virus de la diarrea viral bovina y un virus de Coxsackie humano. En una realización relacionada específica, la composición proporcionada en este aspecto no comprende un adenovirus. En otra realización relacionada específica, la composición proporcionada en este aspecto comprende un adenovirus --por ejemplo, un serotipo de adenovirus seleccionado del grupo que consiste en Ad11, Ad16, Ad21, Ad34, Ad35 y Ad50. En una realización muy específica, el adenovirus es Ad35, y el adenovirus Ad35 comprende opcionalmente una proteína de botón de fibra mutada.

En otro aspecto, se describe en el presente documento un polipéptido aislado que tiene un primer dominio y un segundo dominio, en el que el primer y segundo dominios se unen a CRP, en el que el primer dominio comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 22, SEC ID N°: 23, SEC ID N°: 24, SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 26, SEC ID N°: 27, SEC ID N°: 28, SEC ID N°: 29, SEC ID N°: 30 o SEC ID N°: 31, y en la que X<sub>1</sub> no es aspartato, X<sub>2</sub> no es treonina o X<sub>3</sub> no es isoleucina. En una realización específica, X<sub>1</sub> es glicina o X<sub>1</sub> es glutamato. En otra realización específica, X<sub>2</sub> es alanina, o X<sub>2</sub> es cualquier aminoácido apolar. En otra realización específica más, X<sub>3</sub> es leucina o cualquier aminoácido apolar. En una realización relacionada, el primer dominio comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 19, en la que X<sub>1</sub> no es aspartato; SEC ID N°: 26, en la que X<sub>2</sub> no es treonina; o SEC ID N°: 31, en la que X<sub>3</sub> no es isoleucina. En otra realización relacionada, el segundo dominio comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 19, en la que X<sub>1</sub> no es aspartato; SEC ID N°: 26, en la que X<sub>2</sub> no es treonina; o SEC ID N°: 31, en la que X<sub>3</sub> no es isoleucina. En otra realización relacionada más, el primer y segundo dominios se unen a la misma CRP o, alternativamente, el primer y segundo dominios se unen a CRP diferentes. En las realizaciones descritas en este aspecto, la CRP es CD35, CD46, CD55 o CD59. En una realización específica, la CRP es CD46. En realizaciones relacionadas, el polipéptido produce la internalización o secuestro de la CRP en una célula; y/o el polipéptido se une a la CRP con una constante de disociación (K<sub>d</sub>) de aproximadamente 1 nM o menos, o incluso aproximadamente 0,65 nM o menos. En algunas realizaciones, el polipéptido no es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. El polipéptido puede ser una proteína viral modificada aislada -- por ejemplo, un polipéptido derivado de una proteína de botón de fibra adenoviral. Tal polipéptido derivado de un dominio de botón de fibra de un adenovirus puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en Ad11, Ad16, Ad21, Ad34, Ad35 y Ad50. En una realización muy específica, el polipéptido se deriva del dominio de botón de fibra de Ad35 que comprende al menos una sustitución de aminoácidos en los residuos seleccionados de Asp207, Thr245, Ile256, y una combinación de los mismos; o, más específicamente, la sustitución de aminoácidos es Asp207Gly, Thr245Ala, Ile256Leu, o una combinación de los mismos. En otra realización, el polipéptido es inferior a 25.000 Daltons. En otras realizaciones relacionadas, el polipéptido proporcionado se dimeriza, trimeriza, o incluso se homotrimeriza. En una realización relacionada, el polipéptido se homotrimeriza espontáneamente. Un polipéptido tal que se trimeriza puede adicionalmente tener un dominio de trimerización -- por ejemplo, un dominio de trimerización derivado de una proteína viral. En una realización específica, el dominio de trimerización es un dominio de fibritina del bacteriófago

T4 o un dominio de la proteína  $\sigma 1$  de fibra de reovirus. En una realización muy específica, el dominio de trimerización comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 32. En algunas de las realizaciones proporcionadas en el presente documento, el trímero tiene una estructura tridimensional, y cada polipéptido del homotrímero comprende dos bucles, en el que cada bucle se une a CRP. Específicamente, la secuencia de aminoácidos entre los bucles es sustituible y no altera sustancialmente la unión a la CRP.

En otro aspecto más, se describe en el presente documento un complejo de polipéptido que comprende uno cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento. En una realización, el complejo se une a dos o más moléculas de CRP. En una realización relacionada, la CRP es CD35, CD46, CD55 o CD59. En una realización específica, la CRP es CD46.

En otro aspecto, la invención descrita en el presente documento proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los polipéptidos de la invención descritos en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, la composición farmacéutica comprende además un segundo agente terapéutico. En una realización tal, el segundo agente terapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste en una proteína, un polipéptido, una molécula pequeña, un fármaco, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo híbrido, un conjugado de anticuerpo-fármaco, un ARNip, un ARN antisentido, un miARN, un virus y un aptámero; o el segundo agente terapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente citostático, un agente de quimioterapia, un agente de activación del complemento, un modulador de la expresión de CRP, radiación, un agente inmunomodulador, un agente pro-apoptótico, un inhibidor de la proteína de choque térmico, un inhibidor de la proteasa, un agente desialilante, un inhibidor de MMP y un inhibidor de PKC. En una realización específica, el segundo agente terapéutico es un anticuerpo -- por ejemplo, un anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en aquellos anticuerpos enumerados en la Tabla 1 o, incluso más específicamente, un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en Rituxan, Arzerra, Eribitux, Mylotarg, Campath, Herceptin y Avastin. En otra realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se modifica para potenciar adicionalmente la activación del complemento -- por ejemplo, a modo de una modificación de Fc. En otra realización, el segundo agente terapéutico es un modulador de la expresión de CRP seleccionado de LI1b, IL4 y TGF $\beta$ 1. En otra realización más, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de proteínas de choque térmico seleccionado de desoxiespergualina y geldanamictanoespimicina 17-AAG. En otra realización relacionada, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de la proteasa, agente desialilante o un inhibidor de MMP. En otra realización relacionada más, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de PKC seleccionado de tamoxifeno, enzastaurina y UBN-01. En una realización específica, el segundo agente terapéutico es un agente de quimioterapia. En otra realización específica, el segundo agente terapéutico es un agente inmunomodulador -- por ejemplo, un agente inmunomodulador seleccionado del grupo que consiste en interferón- $\gamma$ , GM-CSF, un agonista de TLR, a NOD receptor agonista, IL2, IL7, IL17, IL21, IL23, TNF, IMiDs, un agonista del receptor de RIG-1, un ligando de linfocitos citolíticos espontáneos, un agente de activación de linfocitos citolíticos espontáneos, un ligando de NKG2P y un anticuerpo natural. En una realización muy específica, el agente de activación de linfocitos citolíticos espontáneos es un anticuerpo anti-CD137. En otra realización muy específica, el ligando de NKG2P está seleccionado de MICa, MICb, RAE1 y ULBP1.

En otro aspecto, se describe en el presente documento un método que comprende poner en contacto una célula diana que expresa una CRP sobre su superficie con un polipéptido cualquiera descrito en el presente documento. En una realización, el péptido está en contacto directo con la célula diana. En otra realización, el polipéptido no es una parte de un vector viral. En una realización relacionada, el poner en contacto una célula diana con un polipéptido aumenta la susceptibilidad de célula diana a un tratamiento con un anticuerpo y/o aumenta la citólisis dependiente del complemento mediada por anticuerpo. En una realización específica, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal --por ejemplo, el anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en aquellos enumerados en la Tabla 1 o, más específicamente, el anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en Rituxan, Arzerra, Erbitux, Mylotarg, Campath, Herceptin y Avastin. En las realizaciones descritas este aspecto, el poner en contacto la célula diana con un polipéptido puede ser *in vitro*, *in vivo* y/o *ex vivo*. En estas realizaciones, la CRP puede ser CD46, CD55, CD59 o CD35 y, en una realización específica, la CRP es CD46. La célula diana puede ser una célula tumoral --por ejemplo, una célula tumoral seleccionada del grupo que consiste en una célula obtenida de un carcinoma, una célula obtenida de un sarcoma, una célula obtenida de un blastoma, una célula obtenida de un cáncer de células germinativas y una célula obtenida de tumor hematológico. En los métodos descritos en este aspecto, los métodos pueden comprender además poner en contacto la célula diana con un segundo agente terapéutico. El poner en contacto con el segundo agente terapéutico puede tener lugar simultáneamente, antes de, o después de poner en contacto con uno cualquiera de los polipéptidos proporcionados en el presente documento. En realizaciones a modo de ejemplo, el segundo agente terapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente citostático, un agente de quimioterapia, un agente de activación del complemento, radiación, un agente inmunomodulador, un agente pro-apoptótico, una proteína, un polipéptido, una molécula pequeña, un fármaco, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo híbrido, un conjugado de anticuerpo-fármaco, un ARNip, un ARN antisentido, un miARN, un virus y un aptámero. En una realización específica, el segundo agente terapéutico es un anticuerpo --por ejemplo, un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en aquellos enumerados en la Tabla 1 o, más específicamente, un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en Rituxan, Arzerra, Erbitux, Mylotarg, Campath, Herceptin y Avastin. En una realización relacionada específica, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se modifica para potenciar adicionalmente la activación del complemento --por ejemplo, una modificación de Fc. En

realizaciones alternativas, el segundo agente terapéutico es un agente de quimioterapia o un agente inmunomodulador. El agente inmunomodulador en tales realizaciones puede seleccionarse del grupo que consiste en interferón- $\alpha$ , interferón- $\gamma$ , GM-CSF, un agonista de TLR, un agonista del receptor de NOD, IL2, IL7, IL17, IL21, IL23, TNF, IMiDs, un agonista del receptor de RIG-1, un ligando de linfocitos citolíticos espontáneos, un agente de activación de linfocitos citolíticos espontáneos y un anticuerpo natural. En los métodos de poner en contacto proporcionados en este aspecto, una actividad, cantidad o densidad de la CRP sobre la superficie celular se reduce al menos el 25 % en algunas realizaciones.

En otro aspecto, se describe en el presente documento un método para tratar un sujeto en necesidad de tratamiento para una afección que implica el sistema inmunitario que comprende administrar al sujeto una cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. En realizaciones específicas, la afección está relacionada con una desregulación de linfocitos citolíticos espontáneos, linfocitos T o linfocitos B, la afección es cáncer, una afección autoinmunitaria, una enfermedad infecciosa, o una afección tras un trasplante. En realizaciones específicas, la afección está seleccionada del grupo que consiste en un carcinoma, un sarcoma, un linfoma, leucemia, un blastoma, o un cáncer de células germinativas.

En otro aspecto, se describe en el presente documento un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido operativamente ligado a una secuencia reguladora, en el que el polipéptido codificado puede reducir la actividad, cantidad o densidad de una CRP sobre una superficie de célula diana en la que el polipéptido codificado comprende una secuencia de aminoácidos que no se produce naturalmente. En realizaciones específicas, el polipéptido codificado comprende al menos una mutación de una proteína que se produce naturalmente o dominio de proteína; el polipéptido codificado comprende al menos el 90 % de homología de secuencias de aminoácidos con una proteína que se produce naturalmente o dominio de proteína; el polipéptido codificado no es una proteína que se produce naturalmente o fragmento de proteína; el polipéptido codificado no es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, factor de crecimiento, citocina, o una región reguladora de la transcripción; y/o el polipéptido codificado tiene al menos 120 aminoácidos de longitud. En una realización relacionada, la CRP es CD46, CD55, CD59 o CD35 o, más específicamente, la CRP es CD46. En un aspecto relacionado, se describe en el presente documento un método de administrar un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido que puede reducir la actividad de una CRP sobre una superficie de célula diana que comprende poner en contacto la célula diana con cualquiera de los vectores descritos en el presente documento.

En otro aspecto, se describe en el presente documento un método para cribar una molécula que puede modificar una actividad de CRP, comprendiendo el método: generar una biblioteca de moléculas candidatas; seleccionar moléculas candidatas que pueden unirse a la CRP; y determinar si la molécula modifica la actividad de la CRP. En una realización, la CRP es CD46, CD55, CD59 o CD35. En una realización específica, la CRP es CD46. En una realización relacionada, la molécula se une a la CRP con una afinidad de unión de 1 nM o menos. En realizaciones relacionadas, la molécula está seleccionada del grupo que consiste en una proteína, un polipéptido, una molécula pequeña, un fármaco, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo híbrido, un conjugado de anticuerpo-fármaco, un ARNip, un ARN antisentido, un miARN, un virus y un aptámero. En una realización específica, la molécula es una molécula pequeña. En otra realización específica, la molécula es un polipéptido. En otra realización más, la molécula modifica la actividad de la CRP por internalización o secuestro de la CRP en una célula. En una realización relacionada, la molécula modifica la actividad de la CRP reduciendo la cantidad o densidad de la CRP sobre una superficie celular.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de la invención que comprende al menos 12 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 3, en la que el polipéptido incluye al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Asp207Gly, Thr245Ala e Ile256Leu, o una combinación de las mismas, y en la que el polipéptido puede formar homotrímeros que pueden unirse a CD46.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la invención que comprende al menos 40 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 3, en la que el polipéptido incluye al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Asp207Gly, Thr245Ala e Ile256Leu, o una combinación de las mismas, y en la que el polipéptido puede formar homotrímeros que pueden unirse a CD46.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición para reducir los niveles en la superficie celular de CD46. La composición según este aspecto de la invención comprende (a) una cantidad de un agente eficaz para reducir los niveles en la superficie celular de CD46, comprendiendo el agente una pluralidad de polipéptidos del dominio de botón de fibra de adenovirus modificados de la invención, en la que los polipéptidos del dominio de botón de fibra de adenovirus modificados pueden formar homotrímeros que tienen afinidad potenciada por unirse a CD46 en comparación con homotrímeros formados a partir de una pluralidad de polipéptidos que consiste en SEC ID N°: 3; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, se describe en el presente documento un método para reducir la cantidad de CD46 sobre una superficie de célula diana. El método según este aspecto comprende poner en contacto una célula diana que

expresa CD46 sobre su superficie con una cantidad de una composición que comprende una pluralidad de polipéptidos del dominio de botón de fibra de adenovirus modificados, en el que los polipéptidos del dominio de botón de fibra de adenovirus modificados pueden formar homotrimeros que tienen afinidad potenciada por unirse a CD46 en comparación con homotrimeros formados a partir de polipéptidos que consisten en SEC ID N°: 3.

En otro aspecto, se describe en el presente documento un método para inducir la citólisis en una célula diana que expresa CD46. El método según este aspecto comprende (a) poner en contacto la célula diana que expresa CD46 sobre su superficie con una cantidad de un agente que comprende una pluralidad de polipéptidos del dominio de botón de fibra de adenovirus modificados eficaz para reducir la cantidad de CD46 presente sobre la superficie de la célula diana; y (b) poner en contacto la célula diana tratada según la etapa (a) con un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a un antígeno sobre la superficie de la célula diana e induce la citólisis.

En otro aspecto, se describe en el presente documento un método de potenciar el efecto antitumoral de un anticuerpo monoclonal anticancerígeno en un sujeto mamífero en necesidad del mismo. Los métodos según este aspecto comprenden (a) administrar al menos una vez al sujeto mamífero una cantidad de una composición que comprende una pluralidad de polipéptidos del dominio de botón de fibra de adenovirus modificados eficaz para reducir la cantidad de CD46 presente sobre la superficie de una célula tumoral diana; y (b) administrar al menos una vez una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anticancerígeno al sujeto, en el que el anticuerpo anticancerígeno se une a un antígeno de superficie de células no CD46 expresado sobre la célula tumoral diana.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende (a) un polipéptido del dominio de botón de fibra modificado de la invención; y (b) un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a un antígeno sobre la superficie de una célula de mamífero e induce la citólisis dependiente del complemento.

En otro aspecto, se describe en el presente documento un método de potenciar el efecto de un agente terapéutico de anticuerpo en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto mamífero. Los métodos según este aspecto comprenden (a) administrar al menos una vez al sujeto mamífero una cantidad de un agente que comprende una pluralidad de polipéptidos del dominio de botón de fibra de adenovirus modificados eficaz para reducir la cantidad de CD46 presente sobre la superficie de una célula diana; y (b) administrar al menos una vez una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico de anticuerpo al sujeto, en el que el agente terapéutico de anticuerpo se une a un antígeno de superficie de células no CD46 expresado sobre la célula diana.

Los polipéptidos, ácidos nucleicos y composiciones descritos en el presente documento son útiles para poner en práctica los métodos de la presente invención.

#### DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los aspectos y muchas de las ventajas auxiliares de la presente invención se apreciarán más fácilmente ya que las mismas se entienden mejor por referencia a la siguiente descripción detallada, cuando se toma conjuntamente con los dibujos adjuntos, en los que:

La FIGURA 1A es una ilustración esquemática del polipéptido de fibra de adenovirus de serotipo 35 (Ad35) no mutante de longitud completa (SEC ID N°: 2) que indica las posiciones relativas del dominio de cola del extremo N (aa 1-45), el dominio de mango (aa 46-133) y el dominio de botón (K) de fibra del extremo C (aa 134-323);

la FIGURA 1B ilustra la secuencia de aminoácidos del dominio de botón (K) (SEC ID N°: 3) del polipéptido de fibra de Ad45 no mutante, en el que las regiones de bucle designadas "DE" (SEC ID N°: 6), "FG" (SEC ID N°: 7), "HI" (SEC ID N°: 8) y "IJ" (SEC ID N°: 9) están subrayadas. Las posiciones de aminoácidos en las que se ha mostrado que las sustituciones suprimen la unión de CD46 se indican por círculos y las posiciones de aminoácidos en las que se ha mostrado que las sustituciones potencian la unión de CD46 se indican por cuadrados;

la FIGURA 1C es un alineamiento de aminoácidos de los dominios de botón de adenovirus para Ad35 no mutante, Ad35K++ mutante (Asp207Gly y Thr245Ala) y otros adenovirus de unión a CD46, es decir, Ad11, Ad16, Ad21, Ad34, Ad35 y Ad50;

la FIGURA 2A ilustra gráficamente los niveles relativos de CD46 sobre la superficie de células HeLa en diferentes momentos de tiempo después de la incubación con Ad35K-279 (suprimido para unirse a CD46), Ad35K (no mutante), Ad45K++ (mutante doble que contiene Asp207Gly y Thr245Ala), o con mAb anti-CD46, en la que los niveles de CD46 se analizaron por citometría de flujo y se expresan como un porcentaje de intensidad media de fluorescencia de CD46 de células sin tratar (N>6), como se describe en el Ejemplo 2;

la FIGURA 2B ilustra gráficamente los niveles relativos de proteína de botón de fibra de Ad35 recombinante sobre la superficie de células HeLa 6 ó 48 horas después de la incubación con Ad35K recombinante (no mutante) o Ad35K++ (mutante doble que contiene Asp207Gly y Thr245Ala), en la que los niveles se analizaron por citometría de flujo usando un anticuerpo anti-marca de His<sub>6</sub>, seguido de un anticuerpo anti-ratón-Alexa Fluor 488, y se expresan como un porcentaje de intensidad media de fluorescencia de células sin tratar (N>6), como se describe en el Ejemplo 2;

la FIGURA 2C ilustra gráficamente los niveles de transducción de células HeLa después de infección por Ad35-

GFP, como se mide por fluorescencia media de GFP de células HeLa 24 horas después de la exposición a MOI crecientes de partículas virales infecciosas de Ad35-GFP, en la que las células HeLa se pre-incubaron con tanto la proteína de botón de fibra recombinante Ad35K-279 (suprimida para unirse a CD46), Ad45K (no mutante) como Ad45K++ (mutante doble que contiene Asp207Gly y Thr245Ala) 72 horas antes de la infección con partículas virales de Ad35-GFP, como se describe en el Ejemplo 2;

la FIGURA 3 ilustra gráficamente los niveles relativos de células Raji viables (positivas para CD20, negativas para CD25) como una medida de la citólisis dependiente del complemento (CDC) después de la pre-incubación con solución salina tamponada con fosfato (PBS), mAb anti-CD46 o proteínas de botón de fibra recombinantes Ad35K (no mutante) o Ad35K++ (mutantes dobles que contienen Asp207Gly y Thr245Ala), seguido de la posterior incubación con rituximab (mAb anti-CD20) o daclizumab (mAb anti-25), y seguido de suero humano normal (NHS) que proporciona complemento, en la que los niveles de viabilidad de células Raji se expresan como un porcentaje de la viabilidad media de células sin tratar (N>6), como se describe en el Ejemplo 2;

la FIGURA 4A ilustra gráficamente la potenciada CDC mediada por rituximab en líneas celulares positivas para CD20 BJAB, Farage y Mino resultantes de la pre-incubación con proteínas de botón de fibra recombinantes Ad35K (no mutantes) o Ad35K++ (mutantes dobles que contienen Asp207Gly y Thr245Ala), en la que los niveles de viabilidad celular se expresan como un porcentaje de la viabilidad media de células sin tratar (N>6), como se describe en el Ejemplo 2;

la FIGURA 4B ilustra gráficamente la potenciada CDC mediada por rituximab en células de linfoma primario de pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) de linfocitos B después de la pre-incubación con proteínas de botón de fibra recombinantes Ad35K (no mutantes) o Ad35K++ (mutantes dobles que contienen Asp207Gly y Thr245Ala), en la que los niveles de viabilidad celular se expresan como un porcentaje de la viabilidad media de células sin tratar (N>6), como se describe en el Ejemplo 2;

la FIGURA 4C ilustra gráficamente que la muestra de células que fue la más resistente a la destrucción por Ad35K++/rituximab (CCL-3) tuvo el menor porcentaje de células CD20+ y los menores niveles de CD20;

la FIGURA 4D ilustra gráficamente que el efecto sensibilizador de Ad35K++ sobre células Raji se observó a una dosis de tan solo 25 ng/ml;

la FIGURA 5A ilustra gráficamente que los niveles relativos de células positivas para CD20 humanas en la médula ósea de ratones con linfoma de xenoinjerto tratados con una primera inyección de tanto Ad35K-279 (suprimido para unirse a CD46) como Ad35K++ (mutante doble que contiene Asp207Gly y Thr245Ala con unión potenciada a CD46), seguido de una segunda inyección de tanto PBS como rituximab (mAb anti-CD20), en la que los niveles de células positivas para CD20 se midieron 6 horas después de la segunda inyección y se expresan como un porcentaje de células en la médula ósea positivas para CD20, como se describe en el Ejemplo 3;

la FIGURA 5B ilustra gráficamente los resultados de un estudio de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones con linfoma de xenoinjerto (que reciben células Raji) tratados con una primera inyección de tanto Ad35K-279 (suprimido para unirse a CD46) como de Ad35K++ (mutante doble que contiene Asp207Gly y Thr245Ala con unión potenciada a CD46), seguido de una segunda inyección de tanto PBS como rituximab (mAb anti-CD20), en la que un grupo de ratones recibió un segundo tratamiento de Ad35K++ / rituximab 48 horas después de la primera inyección de rituximab, como se describe en el Ejemplo 3;

las FIGURAS 5C y 5D ilustran gráficamente los resultados de estudios de supervivencia de ratones con linfoma de xenoinjerto (que recibieron células Farage) tratados con una primera inyección de tanto Ad35K-279 (suprimido para unirse a CD46) como de Ad35K++ (mutante doble que contiene Asp207Gly y Thr245Ala con unión potenciada a CD46), seguido de una segunda inyección de tanto PBS como rituximab (mAb anti-CD20), como se describe en el Ejemplo 3;

la FIGURA 5E ilustra gráficamente el porcentaje de células positivas para CD20 humanas en médula ósea, ganglios linfáticos o bazo en un modelo de ratón de xenoinjerto inyectado con células Farage humanas, pretratado con Ad35K-279 o Ad35K++, luego se sacrificaron 12 horas después de la administración de tanto PBS como rituximab, como se mide por citometría de flujo, como se describe en el Ejemplo 3;

la FIGURA 6 ilustra gráficamente el potenciado efecto de la destrucción de células mediado por CDC observado después de la pre-incubación con proteína de botón de fibra recombinante Ad35K (no mutante) o Ad35K++ (mutante doble que contiene Asp207Gly y Thr245Ala con unión potenciada a CD46), seguido de tratamiento con rituximab en presencia (suero de ratón vacunado con Ad35K++) o ausencia (suero de ratón de control) de anticuerpos reactivos para Ad35K++, que demuestra la ausencia de efecto inhibitor por los anticuerpos anti-Ad35K++ sobre CDC; en la que los niveles de viabilidad celular se expresan como un porcentaje de la viabilidad media de células sin tratar (N>6), como se describe en el Ejemplo 4;

la FIGURA 7A ilustra gráficamente el porcentaje de células positivas para CD20 viables cultivadas de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas (de donantes sanos) después de la incubación con solución salina tamponada con fosfato (PBS), rituximab solo, suero humano normal (NHS), pretratamiento con Ad35K++ más NHS, rituximab más NHS, o pretratamiento con Ad35K++ más rituximab más NHS, como se describe en el Ejemplo 8;

la FIGURA 7B ilustra gráficamente el porcentaje de PBMC humanas viables cultivadas con solución salina tamponada con fosfato (PBS), rituximab solo, suero humano normal (NHS), pretratamiento con Ad35K++ más NHS, rituximab más NHS, o pretratamiento con Ad35K++ más rituximab más NHS, como se describe en el Ejemplo 8;

la FIGURA 7C ilustra gráficamente el porcentaje de viabilidad celular para células endoteliales vasculares humanas primarias, células epiteliales de la córnea, células epiteliales de ovario o células de fibroblastos de

prepuicio incubadas con Ad35K++, rituximab o NHS solo en comparación con células de control tratadas con PBS (N=5), como se describe en el Ejemplo 8;

la FIGURA 8A ilustra gráficamente el porcentaje de células positivas para CD20 humanas en médula ósea o ganglios linfáticos mesentéricos en un modelo de ratón de xenoinjerto inyectado con células Raji humanas, pretratado con Ad35K-279 o Ad35K++, luego se sacrificaron 12 horas después de la administración de tanto PBS como rituximab, como se mide por citometría de flujo (N=5), como se describe en el Ejemplo 9;

la FIGURA 8B es una gráfica de supervivencia de Kaplan-Meier del modelo de xenoinjerto de ratones tratados según el Esquema de tratamiento experimental n° 1 (N=10), que implicó inyectar células Raji en los ratones, pretratar los ratones con Ad35K-279 o Ad35K++, seguido de administración de PBS o rituximab, demostrando un sorprendente aumento en la supervivencia cuando los ratones se trataron con Ad35K++/rituximab en comparación con rituximab solo o control de Ad35K-279, como se describe en el Ejemplo 9;

la FIGURA 8C es una gráfica de supervivencia de Kaplan-Meier de los ratones de xenoinjerto tratados según el Esquema de tratamiento experimental n° 2, que implicó dos ciclos de inyección doble con Ad35K++ seguido de rituximab, que muestra supervivencia a largo plazo en ratones que recibieron 2X (tratamiento con rituximab más Ad35K++), en comparación con ratones de control tratados con PBS, como se describe en el Ejemplo 9;

la FIGURA 8D ilustra gráficamente que en comparación con la proteína Ad35K no mutante, Ad35K++ ejerció un efecto de potenciamiento significativamente más fuerte sobre la terapia con rituximab;

la FIGURA 9A ilustra gráficamente que la preincubación con Ad35K++ potenció la destrucción mediada por CDC de células Raji (positivas para CD52) por Campath (mAb anti-CD52), como se describe en el Ejemplo 10;

la FIGURA 9B ilustra gráficamente que la preincubación con Ad35K++ no tuvo un efecto sobre la viabilidad de células Jurkat (negativas para CD52) en presencia de Campath (mAb anti-CD52), como se describe en el Ejemplo 10;

la FIGURA 10A ilustra gráficamente que la preincubación con Ad35K++ potenció la destrucción mediada por CDC de células de cáncer de mama BT-474 (positivas para Her2/neu) por Herceptin (mAb anti-Her2/neu), como se describe en el Ejemplo 10;

la FIGURA 10B ilustra gráficamente que la preincubación con Ad35K++ no tuvo un efecto sobre la viabilidad de cáncer de mama de células MDA-231 (negativas para Her2/neu) en presencia de Herceptin (mAb anti-Her2/neu), como se describe en el Ejemplo 10;

la FIGURA 11A ilustra gráficamente que la preincubación con Ad35K++ potenció la destrucción mediada por CDC de células de cáncer de colon LOVO (positivas para EGFR) por Erbitux (mAb anti-EGFR), como se describe en el Ejemplo 10;

la FIGURA 11B ilustra gráficamente que la preincubación con Ad35K++ no tuvo un efecto sobre la viabilidad de células HeLa (negativas para EGFR) en presencia de Erbitux (mAb anti-EGFR), como se describe en el Ejemplo 10;

la FIGURA 12 ilustra gráficamente que la preincubación con Ad35K++ potencia la destrucción de AML HL60 (células positivas para CD33) por Mylotarg;

la FIGURA 13 ilustra gráficamente que la preincubación con Ad35K++ potencia la destrucción de células Farage (positivas para CD20) por Arzerra;

la FIGURA 14 ilustra gráficamente la potenciación de mAb, destruyendo por Ad35K++ con suero humano normal (NHS) de diferentes donantes (grupo sanguíneo A y B);

la FIGURA 14A ilustra gráficamente el programa del experimento con células BT474;

la FIGURA 14B ilustra gráficamente el porcentaje de células viables en comparación con células tratadas con PBS;

la FIGURA 14C ilustra gráficamente el programa del experimento con células Farage y Arzerra;

la FIGURA 14D ilustra gráficamente la destrucción de células Farage por Arzerra en presencia de diferentes fuentes de NHS;

la FIGURA 15A ilustra gráficamente la secuencia de ADN de Ad35K++ antes y después de la optimización usando el software DNA2.0;

la FIGURA 15B ilustra gráficamente la secuencia de aminoácidos de Ad35K++ antes y después de la optimización usando el software DNA2.0;

la FIGURA 15C ilustra que la secuencia de ADN de Ad35K++ se comprobó para motivos no deseados;

la FIGURA 15D ilustra la detección de Ad35K++ en HMS174 que contiene pET29-Ad35K++ después de la inducción por IPTG;

la FIGURA 16 ilustra gráficamente datos de un modelo de primate no humano;

la FIGURA 16A ilustra el agotamiento de linfocitos B potenciado por Ad35K++ *in vitro* por rituximab;

la FIGURA 16B ilustra un ensayo de hemaglutinación de Ad35K++ con eritrocitos de macacos (*M. fascicularis* y *M. nemestrina*), babuinos (*P. anubis*), y seres humanos; y

la FIGURA 17 ilustra gráficamente estudios de eficacia con Ad35K++ y rituximab en ratones C57B1/6 transgénicos que fueron dobles transgénicos para CD46 y CD20 humanas.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

A menos que se defina específicamente en el presente documento, todos los términos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entendería un experto en la materia de la presente invención. Los profesionales son particularmente dirigidos a Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3d ed., Cold Spring Harbor Press, Plainsview, New York (2001); y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John

Wiley & Sons, New York (2002) para definiciones y términos de la materia.

Las siguientes definiciones se proporcionan para proporcionar claridad con respecto a los términos que se usan en la memoria descriptiva y reivindicaciones para describir la presente invención.

5 Como se usa en el presente documento, el término “identidad de secuencias” o “porcentaje de idénticas”, como se aplica a moléculas de ácidos nucleicos, es el porcentaje de residuos de ácidos nucleicos en una secuencia de moléculas de ácido nucleico candidata que son idénticas a una secuencia de moléculas de ácido nucleico objeto (tal como la secuencia de moléculas de ácido nucleico expuesta en SEC ID N°: 4), después de alinear las secuencias para lograr la máxima identidad en porcentaje, y sin considerar ninguna sustitución de residuos de ácidos nucleicos como parte de la identidad de secuencias. No se introducen huecos en la secuencia de ácidos nucleicos candidata con el fin de lograr el mejor alineamiento. La identidad de secuencias de ácidos nucleicos puede determinarse del siguiente modo. La secuencia de moléculas de polinucleótido objeto se usa para buscar en una base de datos de secuencias de ácidos nucleicos, tales como la base de datos Genbank, usando el programa BLASTN versión 2.1 (basado en Altschul et al., *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402 (1997)). El programa se usa en el modo sin huecos. Se usa filtrado por defecto para eliminar homologías de secuencias debido a regiones de baja complejidad como se define en J.C. Wootton y S. Federhen, *Methods in Enzymology* 266:554-571 (1996). Se utilizan los parámetros por defecto de BLASTN.

20 Como se usa en el presente documento, el término “identidad en porcentaje” o “porcentaje de idénticas”, cuando se usa a propósito de un polipéptido usado en la práctica de la presente invención, se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia de polipéptidos que son idénticos con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido especificado (tal como la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3), después de alinear las secuencias para lograr la máxima identidad en porcentaje. Cuando se hace la comparación, no se introducen huecos en las secuencias de biomarcador con el fin de lograr el mejor alineamiento. La identidad de secuencias de aminoácidos puede determinarse, por ejemplo, del siguiente modo. La secuencia de aminoácidos de un polipéptido (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 3) se usa para buscar en una base de datos de secuencias de proteínas, tal como la base de datos GenBank usando el programa BLASTP. El programa se usa en el modo sin huecos. Se usa filtrado por defecto para eliminar homologías de secuencias debido a regiones de baja complejidad. Se utilizan los parámetros por defecto de BLASTP.

35 Como se usa en el presente documento, los residuos de aminoácidos se abrevian del siguiente modo: alanina (Ala; A), asparagina (Asn; N), ácido aspártico (Asp; D), arginina (Arg; R), cisteína (Cys; C), ácido glutámico (Glu; E), glutamina (Gln; Q), glicina (Gly; G), histidina (His; H), isoleucina (Ile; I), leucina (Leu; L), lisina (Lys; K), metionina (Met; M), fenilalanina (Phe; F), prolina (Pro; P), serina (Ser; S), treonina (Thr; T), triptófano (Trp; W), tirosina (Tyr; Y) y valina (Val; V).

40 Como se usa en el presente documento, el término “afinidad”, en el contexto de la unión de proteínas, se refiere a la intensidad de la interacción entre las proteínas de unión. La intensidad de la unión generalmente resulta de mayor fuerza intermolecular entre las dos proteínas y produce una asociación más fuerte entre ellas.

Como se usa en el presente documento, la abreviatura “Ad” se refiere a un adenovirus y normalmente va seguido de un número que indica el serotipo del adenovirus. Por ejemplo, “Ad35” se refiere al serotipo de adenovirus 35.

45 Como se usa en el presente documento, el término “polipéptido de fibra” se refiere al polipéptido de fibra de longitud completa expresado por adenovirus (por ejemplo, SEC ID N°: 2) que comprende un dominio de cola del extremo N, un dominio de mango y un dominio de botón del extremo C. Los polipéptidos de fibra se ensamblan espontáneamente en homotrímeros, denominados “fibras”, que se localizan sobre el exterior del virión de adenovirus en la base de cada uno de los doce vértices de la cápside.

50 Como se usa en el presente documento, el término “fibra” se refiere a la estructura de proteína homotrímera compuesta de tres polipéptidos de fibra individuales. La fibra de adenovirus media en contacto con, e internalización en, la célula huésped diana.

55 Como se usa en el presente documento, el término “polipéptido del dominio de botón de fibra” se refiere al dominio del extremo C del polipéptido de fibra que puede formarse en un homotrímero que se une a CD46. Un ejemplo es el dominio de botón de adenovirus de serotipo 35 no mutante expuesto como SEC ID N°: 3, que también se denomina por la abreviatura “polipéptido de Ad35K.” Como se ilustra en la FIGURA 1B, la porción del extremo C de la proteína de fibra puede trimerizarse y formar una estructura de fibra que se une a CD46.

60 Como se usa en el presente documento, el término “polipéptido del dominio de botón de fibra de adenovirus modificado” se refiere a un polipéptido que comprende una variante de un dominio de botón de adenovirus no mutante, en el que el polipéptido modificado comprende al menos una adición, delección o sustitución de aminoácidos o una combinación de los mismos, en el que el polipéptido modificado puede formar homotrímeros que pueden unirse a CD46. Preferentemente, cualquier mutación de sustitución es conservativa porque altera mínimamente las propiedades bioquímicas. Así, si se introducen mutaciones para sustituir residuos de aminoácidos, residuos

positivamente cargados (H, K y R) se sustituyen preferentemente con residuos positivamente cargados; residuos negativamente cargados (D y E) se sustituyen preferentemente con residuos negativamente cargados; residuos polares neutros (C, G, N, Q, S, T e Y) se sustituyen preferentemente con residuos polares neutros; y residuos apolares neutros (A, F, I, L, M, P, V y W) se sustituyen preferentemente con residuos apolares neutros.

5 En el sentido más amplio, los aminoácidos que se producen naturalmente pueden dividirse en grupos basados en la característica química de la cadena lateral de los aminoácidos respectivos. Por aminoácido “hidrófobo” se indica tanto Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val, Ala, Cys como Pro. Por aminoácido “hidrófilo” se indica tanto Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, Arg como His. Esta agrupación de aminoácidos puede subclasificarse adicionalmente del siguiente modo. Por aminoácido “hidrófilo sin carga” se indica tanto Ser, Thr, Asn como Gln. Por aminoácido “ácido” se indica tanto Glu como Asp. Por aminoácido “básico” se indica tanto Lys, Arg como His.

15 Un ejemplo de un polipéptido del dominio de botón de fibra de adenovirus modificado se expone como SEC ID N°: 5, que es la secuencia de dominio de botón de adenovirus 35 no mutante (SEC ID N°: 3), con las sustituciones Asp207Gly y Thr245Ala. El polipéptido del dominio de botón de fibra de adenovirus modificado específico expuesto en SEC ID N°: 5 también se denomina por la abreviatura “polipéptido de Ad35K++.” La localización de sustituciones de aminoácidos específicas, o mutaciones de sustitución, se describen en el presente documento con referencia a la secuencia de polipéptidos de fibra de adenovirus 35 no mutante de longitud completa (SEC ID N°: 2) designando primero el residuo de aminoácido encontrado en la secuencia no mutante, seguido de la posición de aminoácido diseñada dentro de la secuencia no mutante, y designando el residuo de aminoácido encontrado en el polipéptido mutado. Por ejemplo, el término “Asp207Gly” describe una sustitución en la posición de aminoácido 207 en la secuencia no mutante (SEC ID N°: 2), en la que la Asp se sustituye con Gly.

25 Como se usa en el presente documento, el término “contiguo”, en el contexto de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido, se refiere al orden secuencial de residuos de aminoácidos como aparecen en una secuencia de referencia. Una secuencia contigua de aminoácidos generalmente no contiene adiciones, deleciones o sustituciones en la secuencia de referencia. Sin embargo, cuando se especifica en el presente documento, una secuencia contigua de aminoácidos puede contener sustituciones sin destruir la contigüidad de la secuencia. Por ejemplo, la expresión “aminoácidos contiguos de SEC ID N°: 3” se refiere a un orden secuencial de residuos de aminoácidos como aparece en SEC ID N°: 3 sin inserciones, deleciones, o como mucho sustituciones. Esta expresión, sin embargo, permite la incorporación de las sustituciones de aminoácidos adicionalmente descritas (es decir, Asp207Gly, Thr245Ala e Ile256Leu) sin destrucción de la contigüidad de la secuencia.

35 Como se usa en el presente documento, el término “fuente del complemento” se refiere a una mezcla que incluye algunos o todos de los componentes individuales del sistema del complemento necesarios para producir la citólisis y muerte celular tras la inducción, tal como suero humano.

40 Como se usa en el presente documento, el “complejo de ataque de la membrana” (“MAC”) se refiere a un complejo de los componentes del complemento 5 terminal (C5-C9) que se inserta en y rompe membranas celulares.

45 Como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” engloba anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de los mismos, derivados de cualquier mamífero productor de anticuerpos (por ejemplo, ratón, rata, conejo, camélido y primate, que incluye ser humano) o sintéticamente o recombinantemente producidos, que se unen específicamente a una diana de interés o porciones de los mismos. Anticuerpos a modo de ejemplo incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales y recombinantes; anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos); anticuerpos humanizados; anticuerpos murinos; anticuerpos monoclonales quiméricos, de ratón-humano, ratón-primate, primate-humano; y anticuerpos antiidiotípicos, y pueden ser cualquier molécula intacta o fragmento de los mismos.

50 Como se usa en el presente documento, el término “fragmento de unión al antígeno” se refiere a la región de unión al antígeno o variable de o relacionada con un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos ilustrativos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub> y Fv, fragmentos scFv, diacuerpos, nanocuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenario y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

55 Como se usa en el presente documento, un fragmento de anticuerpo “Fv monocatenario” o “scFv” comprende los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptidos. Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión del antígeno.

60 Como se usa en el presente documento, un “anticuerpo quimérico” es una proteína recombinante que contiene los dominios variables y regiones determinantes de la complementariedad derivadas de un anticuerpo de especie no humana (por ejemplo, roedor), mientras que el resto de la molécula de anticuerpo se deriva de un anticuerpo humano.

65 Como se usa en el presente documento, un “anticuerpo humanizado” es un anticuerpo quimérico que comprende una secuencia mínima que se ajusta a regiones determinantes de la complementariedad específicas derivadas de

inmunoglobulina no humana que se trasplanta en una región estructural de anticuerpo humano. Los anticuerpos humanizados normalmente son proteínas recombinantes en las que solo las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo son de origen no humano.

- 5 Como se usa en el presente documento, el término “administración sistémica” pretende incluir, pero no se limita a, vías orales y parenterales que incluyen intramuscular (IM), subcutánea, intravenosa (IV), intrarterial, inhalacional, sublingual, bucal, tópica, transdérmica, nasal, rectal, vaginal, y otras vías de administración que producen eficazmente la dispersión del agente administrado a un único sitio o múltiples sitios de acción terapéutica prevista.

## 10 **PROTEÍNAS REGULADORAS DEL COMPLEMENTO**

CD46 (también conocida como proteína cofactor de membrana MCP), CD55 (también conocida como factor de aceleración de la descomposición DAF) y CD59 (también conocida como protectina) se denominan indistintamente proteínas reguladoras del complemento (CRP), proteínas inhibidoras complementarias unidas a la membrana, reguladores del complemento y similares. La mayoría de las células se protegen del complemento por una o más de estas CRP. CD46 y CD55 dirigen el inicio de las vías en la etapa de C3/C5 convertasa. CD59 bloquea la vía del complemento terminal y previene la formación de MAC uniéndose a C8 y C9 durante el ensamblaje de MAC (Meri et al., 1990). Se ha observado la expresión en exceso de CRP, por ejemplo, en muchos tumores primarios y líneas de células tumorales (Fishelson et al., Mol Immunol 40 (2-4):109-23 (2003); Gelderman et al., Lab Invest 82(4):483-93 (2002); Yan et al., (2008)); enfermedades autoinmunitarias y enfermedades por infecciones.

### **CD46:**

25 CD46 (MCP) es una proteína glicoproteína transmembranaria de tipo 1 expresada sobre las membranas de células nucleadas. La secuencia de proteínas de CD46 humana se proporciona en el presente documento como SEC ID N°: 14, que se corresponde con el número de acceso de GenBank ABK81636. Desde su extremo amino extracelular, la proteína CD46 humana tiene cuatro módulos de proteína de control del complemento (CCP) en tándem: CCP1 (aa 35-88); CCP2 (aa 99-158), CCP3 (aa 162-224) y CCP4 (aa 228-283), seguido de uno o dos dominios ricos en serina/treonina/prolina (STP) altamente glicosilados en O, un dominio transmembrana y la cola citoplásmica. Los cuatro módulos de CCP forman la principal parte del dominio extracelular de CD46. Las CCP contienen tres sitios de glucosilación ligados en N. Los dominios de STP y el dominio de la cola citoplásmica pueden cada uno experimentar corte y empalme alternativo, produciendo cuatro isoformas humanas principales de CD46 (BC1, BC2, C1 y C2) que oscilan en masa molecular de 55 a 65 kDa (A. Gagggar et al., Journal of Virology 79:7503-7513 (2005)).

35 CD46 se describió por primera vez por su unión al complemento y propiedades reguladoras (revisado en M.K. Liszewski et al., Advances in Immunology 61:201-283 (1996)). A este respecto, CD46 protege a la célula de la formación de complejos de ataque de la membrana (MAC) sobre la membrana celular. En particular, CD46 se une a los factores del complemento C4b y C3b que están unidos a la membrana celular y actúa de cofactor para su inactivación proteolítica por el factor I de serina proteasa del plasma. Esta interacción está mediada por los dominios CD46 CCP2, CCP3 y CCP4. La inactivación proteolítica previene la formación de MAC sobre la célula en virtud de prevenir la actividad de convertasa C3 (C3a, C3b) y C5 (C5a, C5b) de los factores del complemento unidos (A. Gagggar et al., Journal of Virology 79:7503-7513 (2005)). Adicionalmente, existen dos isoformas humanas de los dominios citoplásmicos de CD46 que tienen funciones opuestas en la regulación de las reacciones inflamatorias inducidas por linfocitos T (J.C. Marie et al., Nature Immunology 3:659-666 (2002)).

45 Más allá de sus funciones en la regulación de respuestas inmunológicas, CD46 también sirve de receptor para diversos patógenos, que incluyen virus del sarampión, virus del herpes 6 humano y dos tipos de bacterias -- *Streptococcus pyogenes* y *Neisseria gonorrhoeae* patógena. La proteína hemaglutinina del virus del sarampión interacciona con CCP1 y CCP2 de CD46. CCP2 y CCP3 sirven de diana de unión para el virus del herpes 6 humano y *Streptococcus*, mientras que CCP3 y un dominio de STP se requieren para la unión de *Neisseria* (A. Gagggar et al., Journal of Virology 79:7503-7513 (2005)). Adicionalmente, se ha demostrado que CD46 es un receptor de alta afinidad de una serie de serotipos de adenovirus humanos (S. Tuve et al., Journal of Virology 80:12109-12120 (2006); A. Gagggar et al., Nature Medicine 9:1408-1412 (2003); y D. Sirena et al., Journal of Virology 78:4454-4462 (2004)).

55 Adicionalmente, se ha demostrado que CD46 es un receptor de alta afinidad de una serie de serotipos de adenovirus humanos (S. Tuve et al., Journal of Virology 80:12109-12120 (2006); A. Gagggar et al., Nature Medicine 9:1408-1412 (2003); y D. Sirena et al., Journal of Virology 78:4454-4462 (2004)).

60 Se ha mostrado que el dominio CCP2 de CD46 media en la unión de dos serotipos de adenovirus -- Ad11 y Ad35. En particular, la conformación nativa del dominio CCP2 es crucial para la unión de Ad35, y sustituciones en las posiciones de aminoácidos 130 a 135 ó 152 a 156 sobre el dominio suprimen completamente la unión de Ad35. Se ha sugerido que los diversos patógenos que utilizan CD46 para la unión celular lo hacen así debido a que proporciona a los patógenos la oportunidad de modular la respuesta inmunitaria (R. Cattaneo, Journal of Virology 78:4385-4388 (2004)). Por ejemplo, se ha informado que la reticulación de CD46 en la superficie celular, por tanto anticuerpos multivalentes como por virus del sarampión, induce pseudopodios que engullen el ligando en un proceso

similar a la macropinocitosis, conduciendo así a la degradación de CD46 de la superficie celular, que a su vez protege a las células de la lisis del complemento (B. Crimeen-Irwin, et al., *Journal of Biological Chemistry* 278:46927-46937 (2003); J. Schneider-Schaulies, et al., *Journal of Virology* 70:255-263 (1996)).

5 Los adenovirus son virus de ADN bicatenario no envueltos. Los adenovirus humanos se han clasificado en seis subgrupos (A a F) que contiene hasta 51 serotipos. Los adenovirus del grupo B forman dos agrupaciones genéticas – B1 (que incluye los serotipos Ad3, Ad7, Ad16, Ad21 y Ad50) y B2 (que incluye los serotipos Ad11, Ad14, Ad34 y Ad35) (G. Wadell et al., *Annals of the New York Academy of Sciences* 354:16-42 (1980)). La mayoría de los adenovirus B1 están principalmente asociados a enfermedad respiratoria aguda y, a diferencia de los adenovirus del grupo C (por ejemplo, Ad5), no establecen persistencia (G. Wadell, *Current Topics in Microbiology and Immunology* 110:191-220 (1984)). Los serotipos de B2 Ad11p, Ad34 y Ad35 se han asociado principalmente a infecciones de los riñones y las vías urinarias. Los serotipos del grupo B son únicos entre los adenovirus porque no usan receptor de virus de Cocksackie y de adenovirus (CAR) como su receptor de unión primaria. En particular, los serotipos del grupo I de B2, que incluyen Ad16, Ad21, Ad35 y Ad50, usan casi exclusivamente CD46 como receptor; los serotipos del grupo II de B2, que incluyen Ad3, Ad7p y Ad14, usan un receptor todavía sin identificar y no CD46; y finalmente, el serotipo del grupo III de B2 Ad11p usa tanto CD46 como el receptor todavía sin identificar (S. Tuve et al., *Journal of Virology* 80:12109-12120 (2006)).

20 El virión de adenovirus es un icosaedro caracterizado por una fibra localizada en la base de cada uno de los 12 vértices de la cápside. La fibra sobre el virión es una estructura homotrímica que consiste en 3 polipéptidos de fibra individuales. Cada polipéptido de fibra de adenovirus es una estructura asimétrica que consiste en: una cola del extremo N, que interacciona con la proteína de base de pentona de la cápside y contiene las señales necesarias para el transporte de la proteína al núcleo de la célula; un mango, que contiene varias unidades de repetición de 15 residuos; y un dominio de botón del extremo C que contiene los determinantes para la unión del receptor (J.S. Hong y J.A. Engler, *Journal of Virology* 70:7071-7078 (1996)). Adenovirus de todos los grupos, tanto adenovirus que interaccionan con CAR como del grupo B, se unen a sus receptores mediante la estructura de botón sobre el extremo de la fibra (A. Gaggar et al., "CD46 Is a Cellular Receptor for Group B Adenoviruses", *Journal of Natural Medicines* 9:1408-1412 (2003)). Se requiere la trimerización de los polipéptidos de fibra para la unión de adenovirus a sus receptores (J.S. Hong y J.A. Engler, *Journal of Virology* 70:7071-7078 (1996); H. Wang et al., *Journal of Virology* 81:12785-12792 (2007)). Estudios de fibras de Ad2 mutante demuestran que la trimerización de los polipéptidos de fibra solo requiere porciones del dominio de botón del extremo C y una corta porción del extremo C de la región de mango. Parece que al menos la mitad del extremo N de la fibra puede delecionarse sin afectar la trimerización (J.S. Hong y J.A. Engler, *Journal of Virology* 70:7071-7078 (1996)).

35 La estructura específica del dominio de botón de adenovirus se ha determinado para el serotipo Ad5 del grupo C (se une al receptor CAR) (D. Xia et al., *Structure* 2:1259-1270 (1994)), serotipo Ad11 del grupo B (se une al receptor de CD46) (B.D. Persson et al., *Nature Structural & Molecular Biology* 14:164-166 (2007)) y serotipo Ad35 del grupo B (se une al receptor de CD46) (H. Wang et al., *Journal of Virology* 81:12785-12792 (2007)). El dominio de botón homotrímico parece formar una estructura como una hélice de tres palas, por lo que cada pala (es decir, dominio de botón individual) contiene múltiples hojas beta muy compactadas (marcadas A a J). La cristalización del botón de fibra de Ad11 recombinante unido a los dominios de CD46 CCP1 y CCP2 revelaron tres regiones de contacto críticas dentro de los bucles F-G, H-I y I-J del dominio de botón de fibra (B.D. Persson et al., *Nature Structural & Molecular Biology* 14:164-166 (2007)). Este modelo está soportado por estudios que demuestran que la unión del virus Ad11 a CD46 puede suprimirse por la introducción de una sustitución de un único aminoácido (Arg279Gln) dentro del bucle H-I de Ad11 (D.J. Gustafsson et al., *Journal of Virology* 80:1897-1905 (2006) [corrección del autor, 80:5101.]).

Los estudios de cristalización y mutación han iluminado regiones críticas del botón de fibra de Ad35 para la unión a CD46, conduciendo a un modelo de interacción con CD46 del dominio de botón de fibra de Ad35 en el que una unidad de CD46 se une entre cada par de dominios de botón de fibra dentro de la estructura homotrímica del botón (H. Wang et al., *Journal of Virology* 81:12785-12792 (2007), incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad). Así, un único homotrímico de botón de fibra puede reticular tres receptores de CD46. Se ha establecido que se requiere la trimerización para la unión del botón de fibra de Ad35 a CD46 soluble usando un anticuerpo específico para la forma trímica de las proteínas de botón (ab1187-100, lote nº 134173; Abcam), H. Wang et al., *Journal of Virology* 81:12785-12792 (2007). Como se describe en H. Wang et al., se generó una biblioteca de polipéptidos mutantes de botón de fibra de Ad35 usando PCR mutagénica para generar un promedio de una o dos mutaciones de aminoácido por polipéptido del dominio de botón de fibra. La biblioteca se seleccionó doblemente para la trimerización y unión a CD46 soluble. Ninguna de las mutaciones que destruyeron la trimerización fue capaz de unirse a CD46. Se identificaron cuatro residuos en los que las mutaciones suprimieron la unión del botón de fibra de Ad35 a CD46 sin afectar la trimerización: Phe en la posición de aminoácido 242, Arg en la posición 279, Ser en la posición 282 y Glu en la posición 302. Estos residuos se localizaron en áreas correspondientes a las tres regiones de contacto informadas para el dominio de botón de fibra de Ad11. Rondas adicionales de cribado no descubrieron regiones adicionales, que indica que se habían encontrado todas las áreas de interacción críticas de CD46 detectable. La superposición de imágenes cristalográficas indicó que la estructura central entre Ad35 y Ad11 es altamente similar. Además, todas las mutaciones de Ad35 estuvieron en regiones de bucle expuestas dentro de la estructura de botón de fibra de Ad35 globular, enfatizando su función en la unión al receptor. Particularmente, los residuos de contacto en los bucles de F-G y H-I estuvieron situados en lados opuestos

del monómero de Ad35 con respecto al área de contacto en el bucle I-J, que indica que una unidad de CD46 se une entre dos monómeros de botón de fibra de Ad35. Esto estuvo respaldado por los datos de estequiometría que indican una interacción 1:1 entre las moléculas CD46 y los monómeros de botón de fibra de Ad35 (H. Wang et al., *Journal of Virology* 81:12785-12792 (2007)). Así, la interacción de CD46 del dominio de botón de fibra de Ad35 conduce no solo a una estrecha asociación, sino también a la reticulación de varias moléculas de CD46.

#### CD55:

CD55 (DAF) es una proteína de 70 kDa que en seres humanos está codificada por el gen CD55 (Medof ME, et al. (Abril de 1987). "Cloning and characterization of cDNAs encoding the complete sequence of decay-accelerating factor of human complement". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (7): 2007-11). La secuencia de proteínas de CD55 humana se corresponde con el número de acceso de GenBank AAC60633. CD55 es una proteína de la membrana de 70 kDa que regula el sistema del complemento sobre la superficie celular. Previene el ensamblaje del complejo C3bBb (la C3 convertasa de la vía alternativa) o acelera el desensamblaje de la convertasa previamente formada, bloqueando así formación del complejo de ataque de la membrana. La glicoproteína CD55 está ampliamente distribuida entre células hematopoyéticas y no hematopoyéticas. La proteína comparte algunos motivos de repetición de aminoácidos y similitudes funcionales con algunas proteínas del complemento. Osuka et al., "Molecular Cloning and Characterization of Novel Splicing Variants of Human Decay-Accelerating Factor", *Genomics* 88(3):316-322, Septiembre de 2006; han informado de una variedad de variantes de corte y empalme que se expresan en casi todos los tejidos probados, pero varían en sus patrones de expresión. Algunas variantes son formas solubles de CD55 secretada después de la glucosilación (M.A. Davitz et al., Release of Decay-Accelerating Factor (DAF) From the Cell Membrane by Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C (PIPLC)", *Journal of Experimental Medicine* 163(5):1150-1161, Mayo de 1986).

CD55 es un regulador del complemento que funciona intrínsecamente en las membranas de las propias células para eludir la deposición de C3b autólogo sobre sus superficies (V. Nussenzweig et al., "Inhibition of Complement Activation on the Surface of Cells After Incorporation of Decay-Accelerating Factor (DAF) Into Their Membranes", *Journal of Experimental Medicine* 160(5):1558-1578, Noviembre de 1984). Actúa acelerando la descomposición-disociación de las C3 convertasas bimoleculares, las enzimas fundamentales de la amplificación de la cascada (A. Nicholson-Weller et al., "Isolation of a Human Erythrocyte Membrane Glycoprotein With Decay-Accelerating Activity for C3 Convertases of the Complement System", *The Journal of Immunology* 129(1):184-189, Julio de 1982; M.K. Pangburn et al., "Breakdown of C3 After Complement Activation: Identification of a New Fragment C3g, Using Monoclonal Antibodies", *Journal of Experimental Medicine* 156(1):205-216, Julio de 1982; T. Fujita et al., "The Mechanism of Action of Decay-Accelerating Factor (DAF): DAF Inhibits the Assembly of C3 Convertases by Dissociating C2a and Bb", *Journal of Experimental Medicine* 166(5):1221-1228, Noviembre de 1987).

CD55 es el ligando celular para CD97 (J. Hamann et al., "The Seven-Span Transmembrane Receptor CD97 Has a Cellular Ligand (CD55, DAF)", *Journal of Experimental Medicine* 184(3):1185-1189, Septiembre de 1996). CD55 es deficiente en glóbulos rojos de pacientes con hemoglobinuria paroxística nocturna. Las células de estos pacientes dejan de adherirse a las células que expresan el contra-receptor. Una deficiencia de CD55 no parece tener ninguna anomalía hematológica asociada u otra anomalía (D.M. Lublin et al., "Molecular Basis of Reduced or Absent Expression of Decay-Accelerating Factor in Cromer Blood Group Phenotypes", *Blood* 84(4):1276-1282, Agosto de 1994). La ausencia de CD55 en hemoglobinuria paroxística nocturna conduce a la elevada captación de C3b sobre células afectadas (M.E. Medof et al., "Amelioration of Lytic Abnormalities of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria With Decay-Accelerating Factor", *Proceedings of the National Academy of Sciences USA (PNAS)* 82(9):2980-2984, Mayo de 1985).

CD55 se usa como receptor por algunos virus de Coxsackie y otros enterovirus, por ejemplo, ecovirus y virus de Coxsackie B (Karnauchow TM, Tolson DL, Harrison BA, Altman E, Lublin DM, Dimock K (Agosto de 1996). "The HeLa cell receptor for enterovirus 70 is decay-accelerating factor (CD55)". *J. Virol.* 70 (8): 5143-52; Goodfellow et al., *J Gen Virol* 81(5):1393-401 (2000)). Se ha probado Fc de CD55 soluble recombinante en ratones como una terapia anti-enterovirus para lesión al corazón (Yanagawa B, Spiller OB, Choy J, Luo H, Cheung P, Zhang HM, Goodfellow IG, Evans DJ, Suarez A, Yang D, McManus BM (Enero de 2003). "Coxsackievirus B3-associated myocardial pathology and viral load reduced by recombinant soluble human decay-accelerating factor in mice". *Lab. Invest.* 83 (1): 75-85).

#### CD59:

CD59 es una glicoproteína de 18-20 kDa anclada a glicosilfosfatidilinositol (anclada a GPI). La secuencia de proteínas de CD59 humana se corresponde con el número de acceso de GenBank CAG46523. CD59 se expresa sobre leucocitos de sangre periférica humana, eritrocitos y varias líneas celulares humanas. La proteína se expresa también sobre células endoteliales, sobre la vaina de las células de Schwann de fibras nerviosas periféricas, neuronas, microglía, oligodendrocitos, astrocitos, células ependimarias y ciertas células epiteliales tales como células acinares de la glándula salival, epitelio bronquial, túbulos renales y epitelio escamoso (Nose et al., "Tissue distribution of HRF20, a novel factor preventing the membrane attack of homologous complement, and its predominant expression on endothelial cells in vivo", *Immunology* 70(2):145-9, Junio de 1990; Vedeler et al., "The

expression of CD59 in normal human nervous tissue", *Immunology* 82(4):542-7, Agosto de 1994; Hideshima et al., "Expression of HRF20, a regulatory molecule of complement activation, on peripheral blood mononuclear cells", *Immunology* 69(3):396-401, Marzo de 1990).

5 CD59 también se conoce como protectina o antígeno de la superficie celular de leucocitos humanos MIC11, MINI, MIN2, MIN3, MSK21. La proteína se ha identificado como HRF20 [factor de restricción homólogo-20 kDa] y MACIF [factor inhibidor del complejo de ataque de la membrana] (MAC-IP, proteína inhibidora de MAC). Está estrechamente relacionada con el antígeno Ly6 de ratón (Petranka et al., "Structure of the CD59-encoding gene: further evidence of a relationship to murine lymphocyte antigen Ly-6 protein", *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(17):7876-9, Septiembre de 1992). El gen humano da lugar a más de 4 moléculas de ARNm diferentes, que se generan por poliadenilación alternativa (Tone et al., "Gene structure of human CD59 and demonstration that discrete mRNAs are generated by alternative polyadenylation", *J Mol Biol* 227(3):971-6, Octubre de 1992). Otras designaciones son H19, M1RL [inhibidor de membrana de lisis reactiva], P18, 1F5, 16.3A5, BRIC 229, YTH 53.1.

15 La función de CD59 es prevenir la formación de un complejo de ataque de la membrana, formado por las proteínas del complemento terminales activadas C5b a C9, sobre la superficie celular y proteger la célula de la lisis de células mediada por el complemento (para un factor con actividades similares véase también: CD55). Acosta et al. ("Molecular basis for a link between complement and the vascular complications of diabetes", *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(10):5450-5, Mayo de 2000) han informado de que CD59 humana se glica *in vivo* y que CD59 humana glicada pierde su función inhibidora sobre la formación del complejo de ataque de la membrana. La inactivación de CD59 aumenta la liberación inducida por el complejo de ataque de la membrana de factores de crecimiento de células endoteliales.

25 La expresión de CD59 sobre membranas celulares limita la lisis de células por complemento homólogo. La proteína puede no prevenir la destrucción de células por perforinas (Meri et al., "Human protectin (CD59), an 18-20-kD homologous complement restriction factor, does not restrict perforin-mediated lysis", *J Exp Med.* 172(1):367-70, julio de 1990). Las células siguen siendo sensibles al ataque citotóxico por linfocitos activados por IL2 (células LAK), que liberan perforina (Okada et al., "HRF20, a membrane inhibitor of complement attack, does not protect cells from the cytotoxic reaction by lymphokine activated killer cells", *Biochem Biophys Res Commun.* 171(2):717-21, Septiembre de 1990).

35 Hahn et al. ("Overlapping but nonidentical binding sites on CD2 for CD58 and a second ligand CD59", *Science* 256(5065):1805-7, Junio de 1992) han identificado CD59 como un ligando fisiológico para CD2. Sitios de unión sobre CD2 para CD59 y el otro ligando de CD2, CD58, se solapan, pero no son idénticos. CD58 es el principal ligando para CD2 humana y así desempeña una función coestimulante en la activación celular de linfocitos T. Este efecto implica el antígeno coestimulante CD58 (Menu et al., "CD59 costimulation of T cell activation. CD58 dependence and requirement for glycosylation", *J. Immunol.* 153(6):2444-56, Septiembre de 1994). La estimulación de CD59 mediada por CD2 en queratinocitos humanos produce la secreción de IL1-alfa, IL6 y GM-CSF, que puede tener implicaciones para la interacción de queratinocitos con linfocitos T intraepidérmicos (Naderi et al., "CD2-mediated CD59 stimulation in keratinocytes results in secretion of IL-1alpha, IL-6, and GM-CSF: implications for the interaction of keratinocytes with intraepidermal T lymphocytes", *IntJMolMed.* 3(6):609-14, Junio de 1999).

45 Se ha mostrado que CD59 se expresa en exceso en varias líneas celulares de melanoma maligno (Simon et al., "Identification of differentially expressed messenger RNAs in human melanocytes and melanoma cells", *Cancer Res.* 1996 Jul 1;56(13):3112-7 1996). Estas células también liberan constitutivamente una forma bioactiva soluble de CD59 que invierte sus efectos sobre la lisis mediada por el complemento (Brasoveanu et al., "Melanoma cells constitutively release an anchor-positive soluble form of protectin (sCD59) that retains functional activities in homologous complement-mediated cytotoxicity", *J Clin Invest.* 100(5):1248-55, Septiembre de 1997). Ésta modula por disminución la susceptibilidad de células de melanoma humanas a complemento homólogo (Coral et al., "Overexpression of protectin (CD59) down-modulates the susceptibility of human melanoma cells to homologous complement", *J Cell Physiol.* 185(3):317-23, Diciembre 2000).

55 Varios ecovirus usan CD59 como receptor celular o proteína de unión para la infección de células (Goodfellow et al., "Echovirus infection of rhabdomyosarcoma cells is inhibited by antiserum to the complement control protein CD59", *J Gen Virol.* 81(Pt 5):1393-401, Mayo de 2000).

**CD35:**

60 CD35 se conoce indistintamente como receptor 1 del complemento de eritrocitos (CR1), receptor C3b/C4b y receptor de adherencia inmunitaria) es un gen humano. La secuencia de proteínas de CD35 humana se corresponde con el número de acceso de GenBank NM\_000651.4; GI:86793108. La proteína codificada por este gen es un miembro de los reguladores de la familia de activación del complemento (RCA) y se localiza en el región 'RCA de agrupación' del cromosoma 1. El gen codifica una glicoproteína de membrana de tipo I de un único paso monomérica encontrada en eritrocitos, leucocitos, podocitos glomerulares y células dendríticas foliculares esplénicas. El sistema de grupos sanguíneos de Knops es un sistema de antígenos localizado sobre esta proteína. La proteína media en la unión celular a partículas y complejos inmunitarios que tienen complemento activado. Disminuciones en la expresión de

esta proteína y/o mutaciones en su gen se han asociado a carcinomas de vesícula biliar, glomerulonefritis mesangiocapilar, lupus eritematoso sistémico y sarcoidosis. Las mutaciones en este gen también se han asociado a una reducción en la formación de rosetas de *Plasmodium falciparum*, confiriendo protección contra malaria grave. Se han caracterizado variantes de corte y empalme específicas de alelo alternativas, que codifican diferentes isoformas.

5 Se han descrito isoformas específicas de alelo adicionales, que incluyen una forma secretada, pero no se han caracterizado completamente.

En primates, CD35 sirve como el principal sistema para el procesamiento y la eliminación de complejos inmunitarios opsonizados por el complemento. Se ha mostrado que CD35 puede actuar de regulador negativo de la cascada del complemento, mediar en la adherencia inmunitaria y la fagocitosis e inhibir tanto las vías clásicas como alternativas. El número de moléculas de CR1 disminuye con el envejecimiento de los eritrocitos en individuos normales y también disminuye en afecciones patológicas tales como lupus eritematoso sistémico (LES), infección por el VIH, algunas anemias hemolíticas y otras afecciones que caracterizan complejos inmunitarios.

## 15 Composiciones, polipéptidos y métodos

En el presente documento se proporcionan composiciones y métodos para reducir la actividad de CRP sobre una célula diana. Tal reducción puede ser un modo de reducir el número de receptores de CD46, CD55, CD59 o CD35 activos sobre una célula diana; reducir la densidad de receptores de CD46, CD55, CD59 o CD35 activos sobre una célula diana; reducir la densidad de receptores de CD46, CD55, CD59 o CD35 sobre una célula diana; causar la internalización de receptores de CD46, CD55, CD59 o CD35 sobre una célula diana; unir receptores de CD46, CD55, CD59 o CD35 sobre una célula diana; bloquear receptores de CD46, CD55, CD59 o CD35 sobre una célula diana; y/u otra forma de reducir la transducción de señales y la señal efectuada mediante receptores de CD46, CD55, CD59 o CD35 sobre una célula diana. Tal modulación y reducción de la actividad de CRP sobre una célula diana puede ser útil en una variedad de terapéuticos para el tratamiento de, que incluye, pero no se limita a, cánceres, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades infecciosas y afecciones relacionadas con trasplante. En el presente documento se proporcionan polipéptidos modificados o composiciones que comprenden polipéptidos modificados que pueden reducir la actividad, cantidad, densidad, secuestro o internalización de una proteína reguladora del complemento (CRP) sobre una superficie de célula diana, en el que los polipéptidos modificados comprenden secuencias que no se producen naturalmente.

En una realización, los polipéptidos de la presente divulgación tienen al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 125, 130, 140, 150, 160, 170, 175, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, o incluso al menos 500 aminoácidos de longitud. En una realización específica, el polipéptido tiene al menos 125 aminoácidos de longitud. En una realización relacionada, el polipéptido de la presente divulgación no es un péptido. En otra realización relacionada, el polipéptido de la presente divulgación puede adoptar una estructura tridimensional.

En una realización, los polipéptidos de la presente divulgación tienen al menos 1000, 2500, 5000, 7500, 10.000, 15.000, 20.000, 25.000, 30.000, 35.000, 40.000, 45.000, 50.000, 55.000, 60.000, 65.000, 70.000, 75.000, 80.000, 85.000, 90.000, 95.000, o incluso 100.000 Daltons de peso.

En una realización, el polipéptido de la presente divulgación no es un factor de crecimiento o una citocina.

En una realización, el polipéptido de la presente divulgación no se une a una región reguladora de la transcripción. En una realización específica, el polipéptido no se une a una región promotora, región potenciadora, región silenciadora o región aislante de un gen. En otra realización específica, el polipéptido no se une a un factor de transcripción.

En una realización, el polipéptido de la presente divulgación comprende al menos una mutación de una proteína que se produce naturalmente o dominio de proteína. En otra realización, el polipéptido comprende al menos el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o el 100 % de homología de secuencias de aminoácidos con una proteína que se produce naturalmente o dominio de proteína. En otra realización, el polipéptido no es una proteína que se produce naturalmente o fragmento de proteína.

En otra realización, el polipéptido de la presente divulgación tiene un primer dominio y un segundo dominio, en el que el primer y segundo dominios se unen a una CRP, en el que el primer dominio comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 22, SEC ID N°: 23, SEC ID N°: 24, SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 26, SEC ID N°: 27, SEC ID N°: 28, SEC ID N°: 29, SEC ID N°: 30 o SEC ID N°: 31, y en la que  $X_1$  no es aspartato,  $X_2$  no es treonina o  $X_3$  no es isoleucina. En una realización específica,  $X_1$  es cualquier aminoácido excepto aspartato,  $X_1$  es glicina, o  $X_1$  es glutamato. En otra realización específica,  $X_2$  es cualquier aminoácido excepto treonina,  $X_2$  es alanina o  $X_2$  es cualquier aminoácido apolar. En otra realización específica más,  $X_3$  es cualquier aminoácido excepto isoleucina,  $X_3$  es leucina o  $X_3$  es cualquier aminoácido apolar. En una realización relacionada, el primer dominio comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 19, en la que  $X_1$  no es aspartato; SEC ID N°: 26, en la que  $X_2$  no es treonina; o SEC ID N°: 31, en la que  $X_3$  no es isoleucina. En otra realización relacionada, el segundo dominio

comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 19, en la que X<sub>1</sub> no es aspartato; SEC ID N°: 26, en la que X<sub>2</sub> no es treonina; o SEC ID N°: 31, en la que X<sub>3</sub> no es isoleucina.

Descripción de SEC ID N°: 15 a SEC ID N°: 31

- 5  
SEC ID N°: 15.  
(SECUENCIA DE AA DEL BUCLE DE DEL DOMINIO DE BOTÓN DE FIBRA DE AD35)  
**DSSGNLLTX<sub>1</sub>ESDLKIPL**  
en la que X<sub>1</sub> es cualquier aminoácido;
- 10  
en la que X<sub>1</sub> es D (no mutante);  
en la que X<sub>1</sub> es G (mutante); o  
en la que X<sub>1</sub> es E (sustitución conservativa)
- 15  
SEC ID N°: 16.  
(SECUENCIA DE AA PARCIAL DEL BUCLE DE DEL DOMINIO DE BOTÓN DE FIBRA DE AD35)  
**GNULLTX<sub>1</sub>ESDLK**  
en la que X<sub>1</sub> es cualquier aminoácido;
- 20  
en la que X<sub>1</sub> es D (no mutante);  
en la que X<sub>1</sub> es G (mutante); o  
en la que X<sub>1</sub> es E (sustitución conservativa)
- 25  
SEC ID N°: 17.  
(SECUENCIA DE AA PARCIAL DEL BUCLE DE DEL DOMINIO DE BOTÓN DE FIBRA DE AD35)  
**NLLTX<sub>1</sub>ESDL**  
en la que X<sub>1</sub> es cualquier aminoácido;
- 30  
en la que X<sub>1</sub> es D (no mutante);  
en la que X<sub>1</sub> es G (mutante); o  
en la que X<sub>1</sub> es E (sustitución conservativa)
- 35  
SEC ID N°: 18.  
(SECUENCIA DE AA PARCIAL DEL BUCLE DE DEL DOMINIO DE BOTÓN DE FIBRA DE AD35)  
**LLTX<sub>1</sub>ESD**  
en la que X<sub>1</sub> es cualquier aminoácido;
- 40  
en la que X<sub>1</sub> es D (no mutante);  
en la que X<sub>1</sub> es G (mutante); o  
en la que X<sub>1</sub> es E (sustitución conservativa)
- 45  
SEC ID N°: 19.  
(SECUENCIA DE AA PARCIAL DEL BUCLE DE DEL DOMINIO DE BOTÓN DE FIBRA DE AD35)  
**LTX<sub>1</sub>ES**  
en la que X<sub>1</sub> es cualquier aminoácido;
- 50  
en la que X<sub>1</sub> es D (no mutante);  
en la que X<sub>1</sub> es G (mutante); o  
en la que X<sub>1</sub> es E (sustitución conservativa)
- 55  
SEC ID N°: 20.  
(SECUENCIA DE AA PARCIAL DEL BUCLE DE DEL DOMINIO DE BOTÓN DE FIBRA DE AD35)  
**TX<sub>1</sub>E**  
en la que X<sub>1</sub> es cualquier aminoácido;
- 60  
en la que X<sub>1</sub> es D (no mutante);  
en la que X<sub>1</sub> es G (mutante); o  
en la que X<sub>1</sub> es E (sustitución conservativa)
- 65  
SEC ID N°: 21.  
(SECUENCIA DE AA PARCIAL DEL BUCLE DE DEL DOMINIO DE BOTÓN DE FIBRA DE AD35)  
**GNULLTX<sub>1</sub>ES**  
en la que X<sub>1</sub> es cualquier aminoácido;
- en la que X<sub>1</sub> es D (no mutante);  
en la que X<sub>1</sub> es G (mutante); o  
en la que X<sub>1</sub> es E (sustitución conservativa)
- SEC ID N°: 22.  
(SECUENCIA DE AA PARCIAL DEL BUCLE DE DEL DOMINIO DE BOTÓN DE FIBRA DE AD35)  
**GNULLTX<sub>1</sub>**  
en la que X<sub>1</sub> es cualquier aminoácido;
- en la que X<sub>1</sub> es D (no mutante);

en la que X<sub>1</sub> es G (mutante); o  
 en la que X<sub>1</sub> es E (sustitución conservativa)

SEC ID N°: 23.

5 (SECUENCIA DE AA DEL BUCLE FG DEL DOMINIO DE BOTÓN DE FIBRA DE AD35 DE)

**TSETVASSKAFMPSTTAYPFNTX<sub>2</sub>TRDSENYIHGX<sub>3</sub>**

en la que X<sub>2</sub> es cualquier aminoácido;

en la que X<sub>2</sub> es T (no mutante);

en la que X<sub>2</sub> es A (mutante);

10 en la que X<sub>2</sub> es C, G, N, Q, S o Y; o

en la que X<sub>2</sub> es F, I, L, M, P, V o W

en la que X<sub>3</sub> es cualquier aminoácido;

en la que X<sub>3</sub> es I (no mutante)

en la que X<sub>3</sub> es I (mutante)

15 en la que X<sub>3</sub> es A, F, M, P, V o W

SEC ID N°: 24.

(SECUENCIA DE AA PARCIAL DEL BUCLE FG DEL DOMINIO DE BOTÓN DE FIBRA DE AD35)

**FNTX<sub>2</sub>TRDSENYIHGX<sub>3</sub>**

20 en la que X<sub>2</sub> es cualquier aminoácido;

en la que X<sub>2</sub> es T (no mutante);

en la que X<sub>2</sub> es A (mutante);

en la que X<sub>2</sub> es C, G, N, Q, S o Y; o

25 en la que X<sub>2</sub> es F, I, L, M, P, V o W

en la que X<sub>3</sub> es cualquier aminoácido;

en la que X<sub>3</sub> es I (no mutante)

en la que X<sub>3</sub> es I (mutante)

en la que X<sub>3</sub> es A, F, M, P, V o W

30 SEC ID N°: 25.

(SECUENCIA DE AA PARCIAL DEL BUCLE FG DEL DOMINIO DE BOTÓN DE FIBRA DE AD35)

**FNTX<sub>2</sub>TRD**

en la que X<sub>2</sub> es cualquier aminoácido;

en la que X<sub>2</sub> es T (no mutante);

35 en la que X<sub>2</sub> es A (mutante);

en la que X<sub>2</sub> es C, G, N, Q, S o Y; o

en la que X<sub>2</sub> es F, I, L, M, P, V o W

SEC ID N°: 26.

40 (SECUENCIA DE AA PARCIAL DEL BUCLE FG DEL DOMINIO DE BOTÓN DE FIBRA DE AD35)

**NTX<sub>2</sub>TR**

en la que X<sub>2</sub> es cualquier aminoácido;

en la que X<sub>2</sub> es T (no mutante);

en la que X<sub>2</sub> es A (mutante);

45 en la que X<sub>2</sub> es C, G, N, Q, S o Y; o

en la que X<sub>2</sub> es F, I, L, M, P, V o W

SEC ID N°: 27.

(SECUENCIA DE AA PARCIAL DEL BUCLE FG DEL DOMINIO DE BOTÓN DE FIBRA DE AD35)

**TX<sub>2</sub>T**

50 en la que X<sub>2</sub> es cualquier aminoácido;

en la que X<sub>2</sub> es T (no mutante);

en la que X<sub>2</sub> es A (mutante);

en la que X<sub>2</sub> es C, G, N, Q, S o Y; o

55 en la que X<sub>2</sub> es F, I, L, M, P, V o W

SEC ID N°: 28.

(SECUENCIA DE AA PARCIAL DEL BUCLE FG DEL DOMINIO DE BOTÓN DE FIBRA DE AD35)

**X<sub>2</sub>TRDSENYIHGX<sub>3</sub>**

60 en la que X<sub>2</sub> es cualquier aminoácido;

en la que X<sub>2</sub> es T (no mutante);

en la que X<sub>2</sub> es A (mutante);

en la que X<sub>2</sub> es C, G, N, Q, S o Y; o

en la que X<sub>2</sub> es F, I, L, M, P, V o W

65 en la que X<sub>3</sub> es cualquier aminoácido;

en la que X<sub>3</sub> es I (no mutante);

en la que X<sub>3</sub> es I (mutante); o  
 en la que X<sub>3</sub> es A, F, M, P, V o W

SEC ID N°: 29.

(SECUENCIA DE AA PARCIAL DEL BUCLE FG DEL DOMINIO DE BOTÓN DE FIBRA DE AD35)

**TRDSENYIHGX<sub>3</sub>**

en la que X<sub>3</sub> es cualquier aminoácido;

en la que X<sub>3</sub> es I (no mutante);

en la que X<sub>3</sub> es I (mutante); o

en la que X<sub>3</sub> es A, F, M, P, V o W

SEC ID N°: 30.

(SECUENCIA DE AA PARCIAL DEL BUCLE FG DEL DOMINIO DE BOTÓN DE FIBRA DE AD35)

**YIHGX<sub>3</sub>**

en la que X<sub>3</sub> es cualquier aminoácido;

en la que X<sub>3</sub> es I (no mutante);

en la que X<sub>3</sub> es I (mutante); o

en la que X<sub>3</sub> es A, F, M, P, V o W

SEC ID N°: 31.

(SECUENCIA DE AA PARCIAL DEL BUCLE FG DEL DOMINIO DE BOTÓN DE FIBRA DE AD35)

**HGX<sub>3</sub>**

en la que X<sub>3</sub> es cualquier aminoácido;

en la que X<sub>3</sub> es I (no mutante);

en la que X<sub>3</sub> es I (mutante); o

en la que X<sub>3</sub> es A, F, M, P, V o W

En otra realización relacionada más, el primer y segundo dominios se unen a la misma CRP o alternativamente el primer y segundo dominios se unen a CRP diferentes. En las realizaciones proporcionadas en este aspecto de la invención, la CRP es CD35, CD46, CD55 o CD59. En una realización específica, la CRP es CD46. En realizaciones relacionadas, el polipéptido produce la internalización o secuestro de la CRP en una célula; y/o el polipéptido se une a la CRP con una constante de disociación (K<sub>d</sub>) de aproximadamente 1 nM o menos o incluso aproximadamente 0,65 nM o menos. En algunas realizaciones, el polipéptido no es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. El polipéptido puede ser una proteína viral modificada aislada, por ejemplo, un polipéptido derivado de una proteína de botón de fibra adenoviral. Tal polipéptido derivado de un dominio de botón de fibra de un adenovirus pueden seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en Ad11, Ad16, Ad21, Ad34, Ad35 y Ad50. En una realización muy específica, el polipéptido se deriva del dominio de botón de fibra de Ad35 que comprende al menos una sustitución de aminoácidos en los residuos seleccionados de Asp207, Thr245, Ile256, y una combinación de los mismos; o más específicamente la sustitución de aminoácidos es Asp207Gly, Thr245Ala, Ile256Leu, o una combinación de los mismos. En otra realización, el polipéptido es inferior a 25.000 Daltons.

Los polipéptidos proporcionados en el presente documento pueden dimerizarse, trimerizarse, homodimerizarse u homotrimerizarse. En una realización, el polipéptido se dimeriza, homodimeriza, trimeriza u homotrimeriza espontáneamente. El dímero, trímero, homodímero u homotrímero puede tener una estructura tridimensional, en el que cada monómero comprende dos bucles con afinidad por la unión a la CRP. La secuencia entre los bucles puede ser sustituible y sin reducir la unión a la CRP.

En una realización relacionada, en el presente documento se proporciona un polipéptido monomérico que comprende una secuencia que no se produce naturalmente que tras la dimerización o trimerización puede unirse a una proteína reguladora del complemento (CRP). Pueden determinarse formaciones de dímeros, trímeros, homodímeros y homotrímeros según métodos conocidos para los profesionales en la materia. Por ejemplo, la trimerización de polipéptidos puede evaluarse por criterios que incluyen la sedimentación en gradientes de sacarosa, resistencia a la proteólisis por tripsina y movilidad electroforética en geles de poliacrilamida (Hong y Engler, Journal of Virology 70:7071-7078 (1996)).

Los polipéptidos de la presente invención pueden comprender además un dominio de trimerización. En una realización, el dominio de trimerización se deriva de una proteína viral. A modo de ejemplo, el dominio de trimerización es un dominio de fibritina del bacteriófago T4 o un dominio de la proteína  $\sigma$ 1 de fibra de reovirus. En una realización, el dominio de trimerización comprende la secuencia de aminoácidos: GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEC ID N°: 32).

En el presente documento también se proporciona un complejo de polipéptido que comprende al menos uno, dos, tres o más de cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento. En una realización, el complejo de polipéptido puede unirse a dos o más moléculas de CRP. La CRP puede ser CD35, CD46, CD55 o CD59. En una realización específica, la CRP es CD46.

En una realización, el complejo de polipéptido de la presente divulgación tiene al menos 1000, 2500, 5000, 7500, 10.000, 15.000, 20.000, 25.000, 30.000, 35.000, 40.000, 45.000, 50.000, 55.000, 60.000, 65.000, 70.000, 75.000, 80.000, 85.000, 90.000, 95.000, o incluso 100.000 Daltons de peso.

5 En una realización específica, como se describe en el Ejemplo 1, las sustituciones de aminoácidos específicas dentro del dominio de botón de fibra de Ad35 (es decir, polipéptidos del dominio de botón de fibra de Ad35 mutante o modificado) potencian la afinidad de unión de los polipéptidos del dominio de botón de fibra homotrimeros por CD46 en comparación con los polipéptidos del dominio de botón de fibra no mutantes de Ad35. Como se demuestra en el Ejemplo 2, el poner en contacto las células con los polipéptidos del dominio de botón de fibra de Ad35 mutantes induce la internalización de los complejos de CD46-botón de fibra de Ad35, reduciéndose así la prevalencia de CD46 sobre la superficie celular. Además, el polipéptido del dominio de botón de fibra de Ad35 mutante (Asp207Gly y Thr245Ala) con afinidad potenciada de unión por CD46 provocó una mayor reducción de CD46 de la superficie celular, y la reducción duró durante un periodo de tiempo más largo que el observado con el polipéptido del dominio de botón de fibra de Ad35 no mutante. Como se demuestra en los Ejemplos 2 y 3, la reducción transitoria de los niveles de CD46 superficial produjo la sensibilización de células tumorales a la CDC por mAb anticancerígenos. El efecto de sensibilización fue mayor para los polipéptidos del dominio de botón de fibra de Ad35 mutantes con unión potenciada a CD46, seguido del polipéptido del dominio de botón de fibra de Ad35 no mutante, ambos de los cuales tuvieron un mayor efecto que el efecto de sensibilización de mAb anti-CD46. Como se demuestra en el Ejemplo 3, los efectos terapéuticos de esta sensibilización se observaron *in vivo*, en los que los ratones que recibieron xenoinjertos de linfoma tuvieron menores niveles de células de linfoma en su médula ósea y periodos de supervivencia potenciados después de recibir un tratamiento de sensibilización de polipéptidos del dominio de botón de fibra de Ad35 mutantes antes de un tratamiento con mAb. Como se ha demostrado adicionalmente en el Ejemplo 2, la reducción de los niveles superficiales de CD46 inducida por polipéptidos del dominio de botón de fibra de Ad35 mutantes redujo la infectividad celular por un vector Ad35-GFP. Así, la alta afinidad de polipéptidos del dominio de botón de fibra de Ad35 mutantes (por ejemplo, Ad35K++), junto con su capacidad para reticular varias moléculas de CD46, produjeron internalización transitoria de CD46, que a su vez sensibilizó a células de linfoma a la CDC medicada con rituximab *in vitro*, y en un modelo animal *in vivo* de linfoma.

#### Reducción de la actividad de una CRP sobre una superficie de célula diana

30 La unión de los polipéptidos, dímeros o trímeros a una CRP puede determinarse según métodos muy conocidos para los profesionales en la materia. Por ejemplo, la unión a CD46, CD55, CD59 o CD35 puede determinarse por simple transferencia Western o ensayos de resonancia de plasmones superficiales como se describe en Wang, H., et al., Journal of Virology 81:12785-12792 (2007) y en el Ejemplo 1 (para CD46). Por ejemplo, la afinidad de unión de homotrimeros por CD46 puede cuantificarse según métodos muy conocidos para los profesionales en la materia, tales como el ensayo de resonancia de plasmones superficiales descrito en el Ejemplo 1.

Por consiguiente, en una realización, se proporciona un polipéptido modificado que comprende secuencias de aminoácidos que no se producen naturalmente y al menos dos dominios que pueden unirse a una CRP. El propio polipéptido puede unirse a una CRP, o puede dimerizarse, trimerizarse, homodimerizarse u homotrimerizarse para unirse a una CRP. El polipéptido puede ser adicionalmente parte de un complejo de proteína que puede unirse a una CRP. En el presente documento se proporcionan polipéptidos modificados que comprenden secuencias de aminoácidos que no se producen naturalmente, dímeros o trímeros que comprenden estos polipéptidos modificados, o complejos de polipéptido que comprenden dos o más de estos polipéptidos modificados en los que los polipéptidos modificados, dímeros, trímeros o complejos pueden unirse a una CRP con una mayor afinidad (tal como al menos 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 23, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 150, 200, 500, o al menos aproximadamente 1000 veces mayor) en comparación con un polipéptido por lo demás sin modificar, no mutante o parental. Por consiguiente, la constante de disociación ( $K_d$ ) de la CRP por el polipéptido modificado, dímero, trímero o complejo es no superior a 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1,5 nM, 1 nM, 0,9 nM, 0,8 nM, 0,7 nM, 0,65 nM, 0,63 nM, 0,6 nM, 0,5 nM, 0,4 nM, 0,3 nM, 0,25 nM, 0,2 nM, 0,15 nM, 0,1 nM, 0,05 nM, 0,01 nM, 0,005 nM, 0,001nM, 0,0005nM o 0,0001nM. En una realización específica, como se describe en el Ejemplo 1, la  $K_d$  de un polipéptido del dominio de botón de fibra modificado y CD46 es 0,63 nM.

Por consiguiente, en una realización, los polipéptidos modificados proporcionados en el presente documento pueden formar trímeros, u homotrimeros que se unen a una CRP (CD46, CD55, CD59 o CD35) expresada sobre una superficie de célula diana e induce la internalización de la CRP en la célula. En otra realización, los polipéptidos modificados proporcionados en el presente documento pueden formar trímeros, u homotrimeros que se unen a una CRP (CD46, CD55, CD59 o CD35) expresada sobre una superficie de célula diana e induce el secuestro de la CRP. En otra realización más, los polipéptidos modificados proporcionados en el presente documento pueden formar trímeros u homotrimeros que se unen a una CRP (CD46, CD55, CD59 o CD35) expresada sobre una superficie de célula diana y reduce la densidad de CRP receptores sobre la célula diana. En otra realización relacionada, los polipéptidos modificados proporcionados en el presente documento pueden formar trímeros u homotrimeros que se unen a una CRP (CD46, CD55, CD59 o CD35) expresada sobre una superficie de célula diana y reduce la actividad de la CRP sobre la célula diana.

65 En una realización, la incubación con o poner en contacto un polipéptido modificado produce al menos una

reducción del 5 % de los niveles de CRP de la superficie celular, y preferentemente al menos una reducción del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o 70 % en los niveles de CRP de la superficie celular.

5 En otra realización, la incubación con o poner en contacto un polipéptido modificado produce al menos una reducción del 5 % de la densidad de CRP en la superficie celular, y preferentemente al menos una reducción del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o 70 % en la densidad de CRP en la superficie celular.

10 En otra realización, la incubación con o poner en contacto un polipéptido modificado produce al menos una reducción del 5 % de actividad de CRP en la superficie celular, y preferentemente al menos una reducción del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o 70 % en la actividad de CRP en la superficie celular.

15 En otra realización más, la incubación con o poner en contacto un polipéptido modificado produce al menos un aumento del 5 % en el secuestro o internalización de la CRP en la superficie celular, y preferentemente al menos un aumento del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o 70 % en el secuestro o internalización en la superficie celular.

20 En algunas realizaciones, la reducción en los niveles de CRP de la superficie celular, reducción en la densidad de la CRP sobre la superficie celular, reducción de la actividad de la CRP sobre la superficie de célula diana, aumentos en la internalización de CRP, aumentos en el secuestro de CRP por una incubación con un polipéptido modificado dura durante al menos 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, y preferentemente dura durante al menos 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 72 horas o 96 horas, antes de que los niveles de CRP de la superficie celular vuelvan a los niveles de pre-incubación.

25 En una realización a modo de ejemplo, un polipéptido del dominio de botón de fibra modificado que comprende al menos 12 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 3 comprende motivos de andamiaje para facilitar la unión de CD46.

#### **Polipéptidos del dominio de botón de fibra de adenovirus modificados**

30 En una realización a modo de ejemplo, los polipéptidos del dominio de botón de fibra de adenovirus modificados se usan para reducir la actividad de CD46 sobre una superficie celular. La FIGURA 1A es una ilustración esquemática del polipéptido de fibra de adenovirus no mutante de longitud completa serotipo 35 (Ad35), proporcionado como SEC ID N°: 2 (que está codificado por el ADNc proporcionado como SEC ID N°: 1), que indica las posiciones relativas del dominio de cola del extremo N (aa 1-45), el dominio de mango (aa 46-133) y el dominio de botón (k) de fibra del extremo C (aa 134-323). Se determinó previamente que además del dominio de botón (aa 134-323), la sección más hacia el extremo C del dominio de mango (aa 123-133) se requiere para la trimerización de fibra. Hong y Engler, J. Virology 70:7071-7078 (1996). Por consiguiente, como se muestra en la FIGURA 1B, el polipéptido de Ad35 no mutante que engloba una porción de 11 aminoácidos (aa 123-133) del dominio de mango, y el dominio de botón entero (aa 134-323) se proporciona como SEC ID N°: 3. En el presente documento se desvelan sustituciones de aminoácidos numeradas secuencialmente con respecto al primer residuo de aminoácido de SEC ID N°: 2 (mostrado en la FIGURA 1A). Por consiguiente, el primer residuo de aminoácido en SEC ID N°: 3 se corresponde con el aminoácido 123 del polipéptido de fibra de longitud completa (SEC ID N°: 2). Este esquema de numeración también se usa para las posiciones de aminoácidos correspondientes en secuencias de polipéptidos que comprenden solo una subparte o una variación de SEC ID N°: 2 para comunicar la posición relativa de la secuencia con la secuencia de longitud completa.

45 Como se describe en el presente documento, las siguientes sustituciones de aminoácidos en el dominio de botón (SEC ID N°: 3) del polipéptido de fibra (SEC ID N°: 2): residuo de aminoácido 207, en el que la Asp está sustituida por Gly, residuo de aminoácido 245, en el que la Thr está sustituida por Ala, y residuo de aminoácido 256, en el que la Ile está sustituida por Leu, individualmente o en combinación, producen afinidad potenciada de unión de los polipéptidos del dominio de botón de fibra de Ad35 modificados por CD46. Véase la Tabla 2 y Ejemplo 1.

50 Por consiguiente, en algunas realizaciones, la invención proporciona un polipéptido del dominio de botón de fibra modificado de la invención que comprende al menos 12 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 3, en el que el polipéptido incluye al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Asp207Gly, Thr245Ala e Ile256Leu, o una combinación de las mismas, y en el que el polipéptido puede formar homotrimeros que pueden unirse a CD46.

60 Como se usa en el presente documento, la expresión "aminoácidos contiguos de SEC ID N°: 3" se refiere a un orden secuencial de residuos de aminoácidos como aparece en SEC ID N°: 3 sin inserciones, deleciones, o como mucho sustituciones. Esta expresión, sin embargo, permite la incorporación de las sustituciones de aminoácidos descritas (es decir, Asp207Gly, Thr245Ala, Ile256Leu). Así, en una realización a modo de ejemplo, el polipéptido puede comprender al menos los residuos 1-12 de SEC ID N°: 3 (correspondientes a SEC ID N°: 2, residuos de aminoácidos 123-135) y una o más de una sustitución de Gly en la posición 85 (correspondiente a Asp en la posición 207 de SEC ID N°: 2); una sustitución de Thr en la posición 120 (correspondiente a Ala en la posición 245 de SEC ID N°: 2); y/o una sustitución de Ile en la posición 134 (correspondiente a Leu en la posición 134 de SEC ID N°: 2).

65

- En algunas realizaciones, el polipéptido del dominio de botón de fibra modificado comprende al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 100, al menos 200, o al menos 300 aminoácidos contiguos de SEC ID N°: 3 y comprende además al menos una de las sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Asp207Gly, Thr245Ala e Ile256Leu.
- 5 En algunas realizaciones, el polipéptido del dominio de botón de fibra modificado comprende entre al menos 12 y aproximadamente 20 aminoácidos contiguos de SEC ID N°: 3, que incluye al menos una de las sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Asp207Gly, Thr245Ala e Ile256Leu.
- 10 En otras realizaciones, el polipéptido del dominio de botón de fibra modificado comprende entre al menos 20 y aproximadamente 50 aminoácidos contiguos de SEC ID N°: 3, que incluye al menos una de las sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Asp207Gly, Thr245Ala e Ile256Leu.
- 15 En otras realizaciones, el polipéptido del dominio de botón de fibra modificado comprende entre al menos 50 y aproximadamente 100 aminoácidos contiguos de SEC ID N°: 3, que incluye al menos una de las sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Asp207Gly, Thr245Ala e Ile256Leu.
- 20 En otras realizaciones más, el polipéptido del dominio de botón de fibra modificado comprende entre aproximadamente 100 y todos los aminoácidos contiguos de SEC ID N°: 3, que incluye al menos una de las sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Asp207Gly, Thr245Ala e Ile256Leu.
- 25 En una realización, el polipéptido del dominio de botón de fibra modificado comprende al menos 40 aminoácidos contiguos de SEC ID N°: 3, en el que el polipéptido incluye Asp207Gly y Thr245Ala. En una realización, el polipéptido comprende SEC ID N°: 3 con las sustituciones Asp207Gly y Thr245Ala, como se exponen en SEC ID N°: 5, que está codificada por el ADNc expuesto como SEC ID N°: 4.
- 30 En otra realización, el polipéptido del dominio de botón de fibra modificado comprende al menos una de SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, y SEC ID N°: 9. SEC ID N°: 6 es la secuencia de aminoácidos de la región de bucle DE en el dominio de botón de fibra de Ad35 que conecta la hoja beta de D con la hoja beta de E, y se corresponde con una secuencia de aminoácidos contiguos de SEC ID N°: 2 de la posición de aminoácido 199 a la posición de aminoácido 215. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende SEC ID N°: 6 (el bucle DE) que incluye la sustitución de aminoácidos Asp207Gly.
- 35 SEC ID N°: 7 es la secuencia de aminoácidos de la región de bucle FG en el dominio de botón de fibra de Ad35 que conecta la hoja beta de F con la hoja beta de G, y se corresponde con una secuencia de aminoácidos contiguos de SEC ID N°: 2 de la posición de aminoácido 223 a la posición de aminoácido 256. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende SEC ID N°: 7 (el bucle FG) que incluye una o ambas sustituciones de aminoácidos Thr245Ala y/o Ile256Leu.
- 40 SEC ID N°: 8 es la secuencia de aminoácidos de la región de bucle HI en el dominio de botón de fibra de Ad35 que conecta la hoja beta de H con la hoja beta de I, correspondiente a una secuencia de aminoácidos contiguos de SEC ID N°: 2 de la posición de aminoácido 276 a la posición de aminoácido 287. SEC ID N°: 9 es la secuencia de aminoácidos de la región de bucle IJ en el dominio de botón de fibra de Ad35 que conecta la hoja beta de I con la hoja beta de J, correspondientes a una secuencia de aminoácidos contiguos de SEC ID N°: 2 de la posición de aminoácido 297 a la posición de aminoácido 313. En algunas realizaciones, el polipéptido del dominio de botón de fibra modificado es un polipéptido de andamiaje que comprende SEC ID N°: 5, 6, 7 y 8 con el fin de formar un dominio de unión que se une a CD46.
- 45 El análisis de cristalografía del dominio de botón de fibra de Ad35 ha ayudado a demostrar que el bucle FG (SEC ID N°: 7) y el bucle HI (SEC ID N°: 8) están en los lados opuestos del dominio de botón de fibra de Ad35 en comparación con el área de contacto en el bucle IJ (SEC ID N°: 9) (Wang et al., Journal of Virology 81:12785-12792 (2007)). El hecho de que los residuos de aminoácidos dentro de estos bucles sean importantes para la unión de CD46 implica que una unidad de CD46 se une entre dos dominios de botón de fibra de Ad35 (es decir, entre los bucles FG y HI de un dominio de botón de fibra, y el bucle IJ del otro dominio de botón de fibra). Además, los resultados descritos en Wang et al., Journal of Virology 82:10567-10579 (2008), y el Ejemplo 1 respaldan la importancia de las secuencias mutantes englobadas por SEC ID N°: 6 y 7 para la unión potenciada a CD46. El análisis de cristalografía sugiere que una sustitución en el bucle DE (SEC ID N°: 6) de la Asp en la posición 207 por Gly permite que los bucles DE y HI se aproximen a CD46. Esto es debido a que en la unión, el grupo CD46R más próximo a la posición de aminoácido 207 es un residuo de Ile hidrófobo (Ile13). La sustitución de una Gly hidrófoba con una Asp polar puede permitir que el bucle HI de CD46 se mueva más próximo al residuo de Ile13. Similarmente, la introducción de una Ala hidrófoba con Thr en la posición de aminoácido 245 dentro del bucle FG (SEC ID N°: 7) probablemente permite que la Thr en la posición 246 se mueva más próxima a Tyr de CD46 en la posición 46. Por consiguiente, el bucle FG puede moverse más próximo a CD46.
- 50 El análisis de cristalografía del dominio de botón de fibra de Ad35 ha ayudado a demostrar que el bucle FG (SEC ID N°: 7) y el bucle HI (SEC ID N°: 8) están en los lados opuestos del dominio de botón de fibra de Ad35 en comparación con el área de contacto en el bucle IJ (SEC ID N°: 9) (Wang et al., Journal of Virology 81:12785-12792 (2007)). El hecho de que los residuos de aminoácidos dentro de estos bucles sean importantes para la unión de CD46 implica que una unidad de CD46 se une entre dos dominios de botón de fibra de Ad35 (es decir, entre los bucles FG y HI de un dominio de botón de fibra, y el bucle IJ del otro dominio de botón de fibra). Además, los resultados descritos en Wang et al., Journal of Virology 82:10567-10579 (2008), y el Ejemplo 1 respaldan la importancia de las secuencias mutantes englobadas por SEC ID N°: 6 y 7 para la unión potenciada a CD46. El análisis de cristalografía sugiere que una sustitución en el bucle DE (SEC ID N°: 6) de la Asp en la posición 207 por Gly permite que los bucles DE y HI se aproximen a CD46. Esto es debido a que en la unión, el grupo CD46R más próximo a la posición de aminoácido 207 es un residuo de Ile hidrófobo (Ile13). La sustitución de una Gly hidrófoba con una Asp polar puede permitir que el bucle HI de CD46 se mueva más próximo al residuo de Ile13. Similarmente, la introducción de una Ala hidrófoba con Thr en la posición de aminoácido 245 dentro del bucle FG (SEC ID N°: 7) probablemente permite que la Thr en la posición 246 se mueva más próxima a Tyr de CD46 en la posición 46. Por consiguiente, el bucle FG puede moverse más próximo a CD46.
- 55 El análisis de cristalografía del dominio de botón de fibra de Ad35 ha ayudado a demostrar que el bucle FG (SEC ID N°: 7) y el bucle HI (SEC ID N°: 8) están en los lados opuestos del dominio de botón de fibra de Ad35 en comparación con el área de contacto en el bucle IJ (SEC ID N°: 9) (Wang et al., Journal of Virology 81:12785-12792 (2007)). El hecho de que los residuos de aminoácidos dentro de estos bucles sean importantes para la unión de CD46 implica que una unidad de CD46 se une entre dos dominios de botón de fibra de Ad35 (es decir, entre los bucles FG y HI de un dominio de botón de fibra, y el bucle IJ del otro dominio de botón de fibra). Además, los resultados descritos en Wang et al., Journal of Virology 82:10567-10579 (2008), y el Ejemplo 1 respaldan la importancia de las secuencias mutantes englobadas por SEC ID N°: 6 y 7 para la unión potenciada a CD46. El análisis de cristalografía sugiere que una sustitución en el bucle DE (SEC ID N°: 6) de la Asp en la posición 207 por Gly permite que los bucles DE y HI se aproximen a CD46. Esto es debido a que en la unión, el grupo CD46R más próximo a la posición de aminoácido 207 es un residuo de Ile hidrófobo (Ile13). La sustitución de una Gly hidrófoba con una Asp polar puede permitir que el bucle HI de CD46 se mueva más próximo al residuo de Ile13. Similarmente, la introducción de una Ala hidrófoba con Thr en la posición de aminoácido 245 dentro del bucle FG (SEC ID N°: 7) probablemente permite que la Thr en la posición 246 se mueva más próxima a Tyr de CD46 en la posición 46. Por consiguiente, el bucle FG puede moverse más próximo a CD46.
- 60 El análisis de cristalografía del dominio de botón de fibra de Ad35 ha ayudado a demostrar que el bucle FG (SEC ID N°: 7) y el bucle HI (SEC ID N°: 8) están en los lados opuestos del dominio de botón de fibra de Ad35 en comparación con el área de contacto en el bucle IJ (SEC ID N°: 9) (Wang et al., Journal of Virology 81:12785-12792 (2007)). El hecho de que los residuos de aminoácidos dentro de estos bucles sean importantes para la unión de CD46 implica que una unidad de CD46 se une entre dos dominios de botón de fibra de Ad35 (es decir, entre los bucles FG y HI de un dominio de botón de fibra, y el bucle IJ del otro dominio de botón de fibra). Además, los resultados descritos en Wang et al., Journal of Virology 82:10567-10579 (2008), y el Ejemplo 1 respaldan la importancia de las secuencias mutantes englobadas por SEC ID N°: 6 y 7 para la unión potenciada a CD46. El análisis de cristalografía sugiere que una sustitución en el bucle DE (SEC ID N°: 6) de la Asp en la posición 207 por Gly permite que los bucles DE y HI se aproximen a CD46. Esto es debido a que en la unión, el grupo CD46R más próximo a la posición de aminoácido 207 es un residuo de Ile hidrófobo (Ile13). La sustitución de una Gly hidrófoba con una Asp polar puede permitir que el bucle HI de CD46 se mueva más próximo al residuo de Ile13. Similarmente, la introducción de una Ala hidrófoba con Thr en la posición de aminoácido 245 dentro del bucle FG (SEC ID N°: 7) probablemente permite que la Thr en la posición 246 se mueva más próxima a Tyr de CD46 en la posición 46. Por consiguiente, el bucle FG puede moverse más próximo a CD46.
- 65 En una realización, el polipéptido del dominio de botón de fibra modificado comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al

menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o es absolutamente idéntica a SEC ID N°: 3. En una realización, el polipéptido del dominio de botón de fibra modificado comprende la secuencia de aminoácidos de un polipéptido del dominio de botón de fibra de Ad35 mutante que contiene sustituciones de aminoácidos en la posición 207, en la que la Asp está sustituida con Gly, y en la posición 245, en la que la Thr está sustituida con Ala, expuesta como SEC ID N°: 5. La combinación de estas dos sustituciones en el dominio de botón produce un polipéptido del dominio de botón de fibra de Ad35 mutante (también denominado en el presente documento Ad35K++) que se trimeriza para formar una estructura de botón homotrímera con una afinidad para unirse a CD46 que es 23,2 veces superior a la de la estructura de botón homotrímera formada por polipéptido del dominio de botón de fibra de Ad35 no mutante (SEC ID N°: 3) (también denominado en el presente documento Ad35K), como se muestra en la Tabla 2 y Ejemplo 1.

Según este aspecto, el polipéptido del dominio de botón de fibra modificado puede formar estructuras de botón homotrímeras que pueden unirse a CD46 expresada sobre la superficie de una célula. La formación de homotrímeros se produce espontáneamente, y no requiere la totalidad de los polipéptidos de fibra individuales. Como se muestra por Hong y Engler, *Journal of Virology* 70:7071-7078 (1996), incorporado en el presente documento por referencia, la delección de la mitad del extremo N entero de la proteína de fibra de Ad2 no afectó la homotrimerización. Por tanto, como máximo, la mitad del extremo C de la proteína de fibra es suficiente para la trimerización. En particular, los investigadores encontraron que las delecciones más pequeñas en el extremo C (SEC ID N°: 2 aa 123-134) destruyeron la trimerización, mientras que adiciones o sustituciones seleccionadas que preservan la carga del residuo produjeron homotrímeros relativamente estables. Por tanto, la trimerización de fibra puede lograrse con el dominio de botón de fibra entero y al menos los aminoácidos del extremo C (SEC ID N°: 2 aa 123-134) del mango.

La formación de homotrímeros puede determinarse según métodos muy conocidos para los profesionales en la materia. Por ejemplo, la trimerización de las proteínas de botón de fibra puede evaluarse por criterios que incluyen la sedimentación en gradientes de sacarosa, resistencia a la proteólisis por tripsina y movilidad electroforética en geles de poli(acrilamida) (Hong y Engler, *Journal of Virology* 70:7071-7078 (1996)). Con respecto a la movilidad electroforética, el homotrímero de dominio de botón de fibra es un complejo muy estable y migrará a un peso molecular de acuerdo con el de un trímero cuando la muestra no se hierve antes de SDS-PAGE. Tras la ebullición, sin embargo, la estructura trímera se rompe y la proteína migra posteriormente a un tamaño de acuerdo con el monómero de proteína. La trimerización de la proteína de botón de fibra también puede determinarse usando el anticuerpo policlonal de conejo anti-His6-HRP como se describe en Wang, H., et al., *Journal of Virology* 81:12785-12792 (2007) y en el Ejemplo 1.

La unión de los homotrímeros a CD46 puede determinarse según métodos muy conocidos para los profesionales en la materia. Por ejemplo, la unión a CD46 puede determinarse por simple transferencia Western o ensayos de resonancia de plasmones superficiales como se describe en Wang, H., et al., *Journal of Virology* 81:12785-12792 (2007) y en el Ejemplo 1. Además, la afinidad de unión de los homotrímeros por CD46 puede cuantificarse según métodos muy conocidos para los profesionales en la materia, tales como el ensayo de resonancia de plasmones superficiales descrito en el Ejemplo 1.

La formación de homotrímeros puede determinarse en general según métodos muy conocidos para los profesionales en la materia. Por ejemplo, la trimerización de polipéptidos puede evaluarse por criterios que incluyen sedimentación en gradientes de sacarosa, resistencia a la proteólisis por tripsina y movilidad electroforética en geles de poli(acrilamida) (Hong y Engler, *Journal of Virology* 70:7071-7078 (1996)). Con respecto a la movilidad electroforética, el homotrímero de proteína de botón de fibra es un complejo muy estable y migrará a un peso molecular de acuerdo con el de un trímero cuando la muestra no se hierve antes de SDS-PAGE. Tras la ebullición, sin embargo, la estructura trímera se rompe y la migra posteriormente a un tamaño de acuerdo con el monómero de proteína. La trimerización de la proteína de botón de fibra también puede determinarse usando el anticuerpo policlonal de conejo anti-His6-HRP como se describe en Wang, H., et al., *Journal of Virology* 81:12785-12792 (2007) y en el Ejemplo 1.

En una realización específica, como se describe en el Ejemplo 2, la unión de polipéptidos del dominio de botón de fibra de Ad35 modificados (por ejemplo, Ad35K++) a CD46 expresada sobre una membrana celular induce la internalización del complejo de polipéptido del dominio de botón de fibra/CD46 en el interior de la célula, como se describe en el Ejemplo 2. La FIGURA 2A ilustra los niveles en la superficie celular de CD46 sobre células HeLa en diferentes momentos de tiempo después de la adición de 20 µg/ml de PBS (control), Ad35K no mutante (no mutante), Ad35K++ (SEC ID N°: 5) o mAb anti-CD46. Después de 15 minutos, las células puestas en contacto con Ad35K++ tuvieron aproximadamente una reducción del 70 % en los niveles de CD46 sobre su superficie en comparación con las células tratadas con PBS. Ad35K++ provocó la mayor disminución en los niveles de CD46 y el regreso más lento hacia los niveles de pre-incubación. A diferencia, las células tratadas con mAb anti-CD46 solo mostraron aproximadamente una disminución del 30 % en los niveles de CD46 de la superficie con un regreso más rápido a los niveles de pre-incubación.

La FIGURA 2B ilustra los resultados de estudios de citometría de flujo que muestran una disminución de Ad35K unido a célula y Ad35K++, que indica que los polipéptidos del dominio de botón de fibra son internalizados junto con la CD46. Estudios de inmunofluorescencia indicaron que 30 minutos después de poner en contacto células con

Ad35K y Ad35K++, los polipéptidos del dominio de botón de fibra y CD46 se detectaron en endosomas/lisosomas tardíos. Además, 12 horas después de poner en contacto las células con los polipéptidos del dominio de botón de fibra, las células tratadas con Ad35K++ demostraron tinción de CD46 predominantemente citoplásmica con una intensidad que indica degradación de CD46 en los lisosomas. Similar a los resultados en el Ejemplo 2, la reducción mediada por Ad35K++ en los niveles de CD46 superficial se observó para las siguientes células de linfoma/leucemia: Raji, Jurkat, K562, Mo7e, Mino y Farage; y para las siguientes células tumorales sólidas: células A549 (pulmón), SKOV3 (ovario), HT29 (colon) y MDA235MB (mama). De acuerdo con estos resultados, como se muestra en la FIGURA 2C, los intentos por infectar células con Ad35-GFP (que requieren CD46 de superficie para la infección) 72 horas después de poner en contacto las células con botón de fibra de Ad35 o Ad35K++ produjeron células relativamente resistentes, que indica una ausencia de CD46 superficial. Citometría de flujo de CD46 y ensayo de Ad35-GFP similares realizados en otras líneas de células tumorales, tales como células Mo7e de eritroleucemia y células Raji de linfoma B, dieron resultados similares.

#### **Identificación de moléculas que pueden reducir la actividad, cantidad o densidad de una CRP sobre una superficie de célula diana**

En una realización se proporciona un método para cribar una molécula o compuesto que puede modificar una actividad de CRP. El método incluye generar una biblioteca de moléculas candidatas, seleccionar moléculas candidatas que pueden unirse a la CRP y determinar si la molécula modifica la actividad de la CRP. La CRP puede ser CD46, CD55, CD59 o CD35. En una realización específica, la CRP es CD46. En una realización, la molécula se une a la CRP, por ejemplo, con una afinidad de unión de 1 nM o menos. La molécula que se criba puede seleccionarse del grupo que consiste en una proteína, un polipéptido, una molécula pequeña, un fármaco, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo híbrido, un conjugado de anticuerpo-fármaco, un ARNip, un ARN antisentido, un miARN, un virus y un aptámero. En una realización a modo de ejemplo, la molécula es una molécula pequeña. En otra realización a modo de ejemplo, la molécula es un polipéptido. En realizaciones relacionadas, la molécula modifica la actividad de la CRP por internalización o secuestro de la CRP en una célula, o reduciendo la cantidad o densidad de la CRP sobre una superficie celular.

Una molécula que puede modificar la actividad de una CRP o unirse a una CRP puede identificarse por cribado de tanto una población de células como células fraccionadas que expresan una CRP contra moléculas de prueba. Pueden aislarse o identificarse moléculas novedosas usando diferentes compuestos de prueba de composición conocida unidos a un sustrato, tal como una matriz o una pluralidad de partículas, que pueden permitir que una gran cantidad del espacio químico/estructural se muestree adecuadamente usando solo una pequeña fracción del espacio. Como se conoce la composición de cada compuesto de prueba sobre la superficie del sustrato, esto constituye un cribado para elementos de afinidad. Por ejemplo, un compuesto de matriz de prueba comprende compuestos de prueba en localizaciones específicas sobre las localizaciones direccionables del sustrato, y puede usarse para identificar uno o más agentes de unión para una CRP. Los compuestos de prueba pueden estar sin relacionar o relacionados basándose en variaciones menores de una secuencia o estructura de núcleo. Los diferentes compuestos de prueba pueden incluir variantes de un compuesto de prueba dado (tales como isoformas de polipéptidos), compuestos de prueba que están estructuralmente o composicionalmente sin relacionar, o una combinación de los mismos.

Los compuestos de prueba pueden ser moléculas pequeñas, fármacos, peptoides, polisacáridos, compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos, polímeros, lípidos, ácidos nucleicos, polipéptidos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos híbridos, conjugados de anticuerpo-fármaco, ARNip, ARN antisentido, miARN, virus, aptámeros, proteínas, polisacáridos, u otros compuestos. Los compuestos de prueba pueden ser naturales o sintéticos. Los compuestos de prueba pueden comprender o consistir en compuestos heteropoliméricos lineales o ramificados basados en cualquiera de varios enlaces o combinaciones de enlaces (por ejemplo, amida, éster, éter, tiol, adiciones de radicales, coordinación de metales, etc.), estructuras dendríticas, estructuras circulares, estructuras de cavidad u otras estructuras con múltiples sitios de unión próximos que sirven de andamiajes sobre los que se hacen adiciones específicas. Estos compuestos de prueba pueden aplicarse en puntos sobre el sustrato o sintetizarse *in situ*, usando métodos convencionales en la materia. Además, los compuestos de prueba pueden aplicarse en puntos o sintetizarse *in situ* en combinaciones con el fin de detectar interacciones útiles, tales como unión cooperativa.

En una realización, los compuestos de prueba pueden ser polipéptidos con secuencias de aminoácidos conocidas. Por ejemplo, pueden aplicarse CRP solubles a una matriz aplicada con puntos sobre un portaobjetos que contiene entre algunos y 1.000.000 de polipéptidos de prueba que tienen una longitud de aminoácidos variables. Los polipéptidos pueden unirse a la superficie mediante el extremo C. La secuencia de los polipéptidos puede generarse aleatoriamente a partir de 19 aminoácidos, excluyendo cisteína. La reacción de unión puede incluir un competidor no específico, tal como proteínas bacterianas en exceso marcadas con otro colorante de forma que pueda determinarse la relación de especificidad para cada polipéptido que se une a diana. Pueden seleccionarse los polipéptidos con la mayor especificidad y unión. Se conoce la identidad del polipéptido sobre cada punto, y así puede identificarse fácilmente.

Un anticuerpo o anticuerpo sintético que va a usarse como modulador de la actividad de CRP puede identificarse

mediante una matriz de péptidos. Otro método es el uso de generación de anticuerpo sintéticos mediante expresión en fago de anticuerpos. Las bibliotecas de bacteriófagos M13 de anticuerpos (por ejemplo, Fab) se expresan sobre las superficies de partículas de fago como fusiones con una proteína de la envuelta. Cada partícula de fago muestra un anticuerpo único y también encapsula un vector que contiene el ADN que codifica. Pueden construirse bibliotecas altamente diversas y representarse como conjuntos de fagos, que pueden usarse en la selección de anticuerpos para unirse a antígenos inmovilizados. Los fagos de unión a antígeno son retenidos por el antígeno inmovilizado, y los fagos que no se unen se eliminan lavando. El conjunto de fagos retenidos puede amplificarse por infección de un huésped de *Escherichia coli* y el conjunto amplificado puede usarse para rondas adicionales de selección para obtener eventualmente una población que está dominada por clones que se unen al antígeno. En esta etapa, clones de fase individuales pueden aislarse y someterse a secuenciación de ADN para descodificar las secuencias de los anticuerpos expresados. Mediante el uso de expresión en fago y otros métodos conocidos en la técnica, pueden generarse anticuerpos de diseño de alta afinidad por CRP.

También pueden usarse ensayos basados en perlas para identificar agentes novedosos que pueden unirse o de otro modo modular la actividad de CRP.

El agente de unión de CRP o agente modulador también puede ser un aptámero novedoso. Un aptámero para una diana puede identificarse usando evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX) (Tuerk & Gold, Science 249:505-510, 1990; Ellington & Szostak, Nature 346:818-822, 1990), tal como se describe en la patente de EE.UU. n° 5.270.163. Una biblioteca de ácidos nucleicos pueden ponerse en contacto con una CRP diana, y aquellos ácidos nucleicos unidos específicamente a la diana se dividen del resto de ácidos nucleicos en la biblioteca que no se unen específicamente a la diana. Los ácidos nucleicos divididos se amplifican para dar un conjunto enriquecido en ligando. Múltiples ciclos de unión, división y amplificación (es decir, selección) producen la identificación de uno o más aptámeros con la actividad deseada. También pueden usarse métodos modificados, tales como Laser SELEX o deSELEX como se describen en la publicación de patente de EE.UU. n° 20090264508.

#### **Identificación de polipéptidos modificados para reducir la actividad, cantidad o densidad de una CRP sobre una superficie de célula diana**

Los avances en la ingeniería de proteínas y la disponibilidad de poderosas tecnologías de selección de bibliotecas han permitido la exploración de numerosos andamiajes de proteínas alternativos diseñados para la unión a prácticamente cualquier diana de proteína de elección. Las bibliotecas de andamiajes se basan en motivos conformacionales de proteínas que presentan diversas características de unión. Las categorías incluyen sándwich  $\beta$ , barril  $\beta$ , haz de tres hélices, proteínas de repetición, agentes de unión de péptido, andamiajes pequeños, andamiajes que presentan péptidos limitados, andamiajes con fluorescencia intrínseca, andamiajes con actividad enzimática intrínseca, inhibidores de la proteasa y andamiajes unidos por disulfuro (Binz, H.K. y Pluckthun, A., "Engineered Proteins as Specific Binding Reagents", Current Opinion in Biotechnology 16:459-469 (2005)). Generalmente, puede generarse una selección de expresión en fago, como se ha descrito anteriormente, para crear numerosas variantes de motivos de unión de proteína conocidos. Las variaciones particulares que se unen a una diana particular pueden seleccionarse y secuenciarse. A este respecto, uno o más dominios de un polipéptido candidato, por ejemplo, la secuencia del dominio de botón de adenovirus, pueden incorporarse en un motivo de andamiaje seleccionado, puede crearse una biblioteca de variantes con técnicas tales como selección por expresión en fago, y la eficacia de los andamiajes alternativos puede evaluarse para la unión a CRP (CD46, CD655 o CD59) y el efecto terapéutico usando los ensayos a modo de ejemplo descritos en los ejemplos en el presente documento.

Pueden producirse polipéptidos modificados usando métodos de expresión recombinante que son rutinarios para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, el polipéptido del dominio de botón de fibra de Ad35 recombinante que comprende SEC ID N°: 5 (Ad35K++) puede producirse clonando la secuencia de ADNc que codifica Ad35K++ (SEC ID N°: 4), con o sin una marca de His, en un vector de expresión tal como el vector de expresión pQE-30Xa (Qiagen). Después de la transformación en *E. coli*, la expresión de proteínas se induce mediante la adición de isopropil- $\beta$ -D-tio-galactósido (IPTG), a continuación se purifica la proteína y se digiere con factor Xa proteasa, como se ha sugerido por el fabricante. Después de la digestión, el factor Xa proteasa se elimina usando resina de eliminación de Xa. A continuación, los péptidos marcados con His<sub>6</sub> escindidos y la proteína marcada con His<sub>6</sub> sin digerir se capturan y se eliminan usando cromatografía de afinidad por Ni-NTA, como se describe en las instrucciones del fabricante.

En una realización, en el presente documento se proporciona un método de identificar polipéptidos que pueden unirse a una CRP que comprende las etapas de: aplicar un algoritmo de modelado molecular tridimensional a las coordenadas atómicas de la CRP para determinar las coordenadas espaciales para el (los) dominio(s) de unión de la CRP; y cribar electrónicamente las coordenadas espaciales guardadas de un conjunto de polipéptidos candidatos contra las coordenadas espaciales del (de los) dominio(s) de unión de CRP para identificar polipéptidos que pueden unirse a la CRP.

En otra realización en el presente documento se proporciona un método de identificar polipéptidos que pueden unirse a una CRP que comprende las etapas de proporcionar una estructura cristalina de la CRP y los polipéptidos candidatos; superponer la estructura cristalina de la CRP y un polipéptido candidato; y determinar si hay una afinidad

de bases estructurales entre el polipéptido candidato y la CRP.

En otra realización más, en el presente documento se proporciona un método para cribar un polipéptido de alta afinidad que puede unirse a una CRP, comprendiendo dicho método: generar una biblioteca de polipéptidos candidatos; seleccionar polipéptidos candidatos capaces de homotrimerización; seleccionar polipéptidos candidatos que pueden unirse a la forma soluble de la CRP; e identificar aquellos polipéptidos que pueden unirse a la CRP con una afinidad de unión de 0,65 nM o menos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la invención, en las que dicho polipéptido comprende un polipéptido del dominio de botón de fibra modificado que comprende al menos 40 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 3. Para la proteína de botón de fibra de Ad35, la mutación está seleccionada del grupo que consiste en Asp207Gly, Thr245Ala e Ild245Leu. Las mutaciones en el dominio de botón de fibra de Ad35 (SEC ID N°: 3) están numeradas secuencialmente según el primer residuo de aminoácido del polipéptido de fibra de longitud completa (SEC ID N°: 2).

En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico. En una realización a modo de ejemplo, el ácido nucleico comprende además secuencias de nucleótidos que codifican las regiones de péptidos SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8 y SEC ID N°: 9. Como se ha descrito anteriormente, estos fragmentos de péptidos se corresponden con el bucle DE, bucle FG, bucle HI y bucle IJ, respectivamente, de un polipéptido del dominio de botón de fibra de Ad35. En una realización, se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de andamiaje que se une a CD46 y comprende las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las regiones de péptidos SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7 y SEC ID N°: 8 separadas por residuos de ácidos nucleicos intermedios.

En una realización, el ácido nucleico aislado codifica el dominio de botón de fibra de Ad35 mutante (Ad35K++ Asp207Gly y Thr245Ala), expuesto como SEC ID N°: 5. Un experto entenderá que debido a la degeneración del código genético, cada aminoácido en una secuencia de polipéptidos puede codificarse por una multiplicidad de unidades de codón tri-nucleótido conocidas. Los variedades de codones que codifican cada aminoácido es muy conocida. Como tal, un polipéptido, tal como SEC ID N°: 5, puede codificarse predeciblemente por numerosos ácidos nucleicos, cada uno con variaciones únicas en sus secuencias. Por consiguiente, se contempla la variedad de ácidos nucleicos que, mediante la degeneración del código genético, codifican todos el polipéptido de SEC ID N°: 5. En otra realización, el ácido nucleico comprende SEC ID N°: 4.

En otro aspecto, se proporciona un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica los polipéptidos descritos en el presente documento. Un vector de expresión es una construcción usada para introducir un gen en una célula diana, que permite que la célula produzca cantidades de ARN mensajero (ARNm) estable a partir del gen. Un ejemplo no limitante de vectores de expresión comercialmente disponibles incluye pQE100 (Qiagen, Valencia, CA) como se usó en el Ejemplo 1. El vector de expresión comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende al menos 12 aminoácidos contiguos de SEC ID N°: 3 e incluye al menos una de las sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Asp207Gly, Thr245Ala e Ild245Leu.

Independientemente de la fuente del vector, un experto habitual en la materia apreciará que un vector de expresión que comprende el ácido nucleico descrito también tendrá una secuencia de control de la expresión operativamente ligada a la secuencia de ácidos nucleicos descrita. Tal secuencia de control de la expresión puede incluir secuencias promotoras o potenciadoras para permitir o facilitar que la maquinaria de transcripción de la célula huésped cree copias de ARNm del ácido nucleico. Específicamente, las secuencias promotoras proporcionan un sitio para que la enzima de ARN polimerasa de las células se una a la secuencia de ADN próxima al gen elegido como diana para transcribirse en ARNm. Realizaciones preferidas comprenden regiones promotoras o potenciadoras tales que permitan la producción de grandes cantidades de ARNm que, a su vez, permiten que la maquinaria de traducción celular produzca grandes cantidades de polipéptidos codificados por el ácido nucleico. Ejemplos no limitantes de una secuencia de control de la expresión tal es el operón lac, que contiene secuencias promotoras y represoras. La secuencia represora puede bloquearse por análogos de lactosa, tales como isopropil-β-D-tio-galactósido (IPTG), permitiendo así que los elementos promotores del operón faciliten la transcripción génica.

También se apreciará por expertos habituales en la materia que el vector de expresión puede contener un marcador de selección, un gen tal que confiere resistencia a un agente antibiótico a la célula que contiene el vector y expresa el gen marcador de resistencia. En virtud de este gen marcador de resistencia, las células que reciben satisfactoriamente el vector y expresan genes codificados por ellas pueden aislarse de células que no. Ejemplos no limitantes de tales marcadores de selección son genes que confieren resistencia a antibióticos, tales como kanamicina y ampicilina.

En otro aspecto, se proporciona una célula cultivada que se transfecta con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido descrito anteriormente. A este respecto, una célula se transfecta satisfactoriamente con un vector en el que la maquinaria de transcripción de la célula intacta tiene acceso al molde de ácido nucleico para la producción de ARNm. Protocolos para facilitar la transfección de vectores en células son muy conocidos en la técnica.

En otra realización, en el presente documento se describe la progenie de una célula cultivada que se transfectó establemente con el vector como se ha descrito anteriormente. Tal progenie contendrá copias del vector que no se han sometido al protocolo de transfección y pueden transcribir los ácidos nucleicos contenidos en el vector bajo el control de una secuencia de control de la expresión.

Las técnicas que utilizan células cultivadas transfectadas con vectores de expresión para producir cantidades de polipéptidos son muy conocidas en la técnica. Wang, H., et al., Journal of Virology 81:12785-12792 (2007), que se incorpora en el presente documento por referencia, proporciona un ejemplo no limitante de una técnica tal. Brevemente, se usa un vector de expresión que incluye un operón lac adyacente al sitio de clonación del gen diana. La secuencia del vector también codifica un motivo de repetición de seis residuos de His en el extremo N del gen de interés. Después de la transfección en células bacterianas de *Escherichia coli*, la expresión del gen puede inducirse por incubación con IPTG a una concentración de 1 mM. Después de una duración de tiempo suficiente, tal como 5 horas, las células se recogen y se lisan usando un tampón (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM), seguido de incubación con 1 mg/ml de lisozima durante 30 minutos sobre hielo y sonicación. El residuo celular se elimina por centrifugación y el sobrenadante se incubaba con perlas de agarosa Ni-ácido nitrilotriacético (NTA) a 4 °C durante 3 horas. La agarosa NTA se une a las marcas de His, facilitando la purificación de proteínas. Las perlas se recogen y se lavan con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 60 mM y 20 % de glicerol. La proteína recombinante se eluye de las perlas de NTA con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM y 20 % de glicerol.

#### Métodos de reducción de la cantidad de CD46 sobre una superficie de célula diana

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición para reducir los niveles en la superficie celular de CD46, que comprende: (a) una cantidad de un agente eficaz para reducir los niveles en la superficie celular de CD46, comprendiendo el agente una pluralidad del polipéptido de la invención, en el que dicho polipéptido comprende un dominio de botón de fibra de adenovirus modificado, en el que el dominio de botón de fibra de adenovirus modificado puede formar homotrímeros que tienen afinidad potenciada por unirse a CD46 en comparación con homotrímeros formados a partir de una pluralidad de polipéptidos que consisten en SEC ID N°: 3, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable. Polipéptidos del dominio de botón de fibra de adenovirus modificados para su uso en los métodos se describen en el presente documento. Polipéptidos del dominio de botón de fibra de adenovirus modificados adicionales para su uso en los métodos de este aspecto pueden derivarse de cualquier serotipo de adenovirus que pueda unirse a CD46 mediante su dominio de botón de fibra usando mutagénesis rutinaria y métodos de cribado, tales como los métodos descritos en el Ejemplo 1. Por ejemplo, los serotipos del grupo B 11, 16, 21, 34, 35 y 50 producen polipéptidos del dominio de botón de fibra que pueden unirse a CD46. Además, se contempla que dominios de botón de polipéptidos de fibra de adenovirus que reconocen el receptor CAR puedan modificarse suficientemente para permitir la unión de la estructura de botón trímera a CD46.

La unión de CRP puede realizarse por diversos métodos muy conocidos. Un método a modo de ejemplo se describe en detalle en el Ejemplo 1 para la unión de CRP, en el que una biblioteca de dominios de botón de fibra mutante se crea y se selecciona para la fuerte unión de CD46. Brevemente, se realiza PCR mutagénica aleatoria usando ADN que codifica una secuencia de polipéptidos del dominio de botón de fibra de adenovirus no mutante como molde. Los productos de amplificación se clonan en vectores de expresión, y se transforman en células que entonces se siembran sobre placas de agar. Después de inducir la expresión de proteínas, colonias bacterianas se transfieren a filtros, sobre los que se visualiza la unión de CD46 incubando en secuencia con CD46 soluble, mAb anti-CD46 y anticuerpos anti-Ig marcados. El ADN de las colonias que presentan las señales de unión más fuertes puede entonces secuenciarse fácilmente, e identificarse mutaciones favorables. Se conocen en la técnica otras estrategias de selección de alto rendimiento para identificar mutaciones de potenciamiento. Por ejemplo, pueden realizarse eficazmente selecciones de expresión en fago y de expresión en péptido sobre amplios números de variantes (que se aproximan a 10<sup>8</sup>). Las variantes de polipéptidos que presentan capacidad de unión potenciada se asocian físicamente al gen que las codifica, permitiendo así la fácil determinación de la secuencia de las mutaciones favorables (tratado en Clackson, T., y Wells, J.A., "In Vitro Selection From Protein and Peptide Libraries", TibTech, 12:173-184 (1994)). Otros métodos de producción de polipéptidos del dominio de botón de fibra de adenovirus modificados incluyen la utilización de técnicas convencionales para manipular el ADN que codifica botón de fibra no mutante, tal como digestión con restricción, y mutación basada en el diseño racional. También se contempla la síntesis artificial de polipéptidos preferidos.

En realizaciones en las que el polipéptido del dominio de botón de fibra de adenovirus modificado se deriva del serotipo de adenovirus 35, los polipéptidos de Ad35K modificados descritos en el presente documento son útiles en la práctica del método según este aspecto. En algunas realizaciones de este método, el polipéptido de adenovirus modificado comprende al menos 12 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 3, en la que el polipéptido incluye al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Asp207Gly, Thr245Ala e Ile256Leu, o una combinación de las mismas.

Para facilitar la capacidad de los homotrímeros formados a partir de los polipéptidos individuales para unirse a CD46, los homotrímeros forman preferentemente estructuras de botón con hojas beta muy compactas. En una realización

preferida, el polipéptido contiene secuencias correspondientes a las hojas beta (I-J) y que retienen la estructura secundaria de la hoja beta. En otra realización, el polipéptido contiene secuencias correspondientes a los bucles F-G, H-I y I-J, que conectan las hojas beta y presentan puntos de contacto con CD46. La FIGURA 1B ilustra a modo de ejemplo dominios de bucle de hojas beta dentro de la secuencia de una secuencia del dominio de botón de fibra.

En algunas realizaciones, el polipéptido del dominio de botón de fibra modificado comprende secuencias al menos el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, o incluso al menos el 80 % idénticas (tal como al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o el 100 % idénticas) a SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8 y SEC ID N°: 9, e incluye adicionalmente un aminoácido correspondiente a SEC ID N°: 2 aminoácido 207, en el que la Asp está sustituida con Gly, y SEC ID N°: 2 aminoácido 245, en el que la Thr está sustituida con Ala. Estas secuencias incorporadas en el polipéptido del dominio de botón de fibra modificado pueden estar situadas en cualquier orden. En realizaciones preferidas, estas secuencias están separadas por dominios de polipéptido que presentan estructuras secundarias de hoja beta.

Según los métodos de este aspecto de la invención, la unión por el homotrímero formado a partir del polipéptido del dominio de botón de fibra modificado a CD46 induce la internalización de CD46 en la célula. Métodos a modo de ejemplo para detectar la internalización de CD46 se describen en el Ejemplo 2. Según el método proporcionado, células diana se ponen en contacto con composiciones que comprenden un polipéptido del dominio de botón de fibra modificado en una cantidad y tiempo suficiente para producir al menos una reducción del 40 % de los niveles de CD46 sobre la superficie celular en comparación con poner en contacto células diana con un control, tal como PBS. En realizaciones preferidas, la reducción de los niveles de CD46 sobre la superficie celular es al menos el 50 %, preferentemente el 60 %, más preferentemente el 70 %, y más preferentemente el 80 %. En realizaciones adicionales, el poner en contacto las células diana con composición suficiente que comprende el polipéptido del dominio de botón de fibra modificado produce una mayor reducción de CD46 de la superficie celular en comparación con la reducción producida por polipéptido del dominio de botón de fibra no mutante o mAb anti-CD46 bajo las mismas condiciones.

#### **Poner en contacto células con un polipéptido que puede reducir la actividad de una CRP**

El método puede ponerse en práctica usando cualquier célula diana que exprese una CD46, CD55, CD59 o CD35 (una CRP) sobre la superficie celular, que incluye células diana que residen en el cuerpo de un sujeto mamífero o en cultivo de tejido. En algunas realizaciones, como se describen en más detalle en el presente documento, las células diana son células de cáncer o tumorales. En algunas realizaciones, las células diana son vulnerables a la infección por patógenos que se unen a CD46, CD55, CD59 o CD35, tales como, por ejemplo, adenovirus, virus del herpes, virus del sarampión, pestivirus, ecovirus y virus de Coxsackie B, *Streptococcus pyogenes* y *Neisseria gonorrhoeae*. Los métodos proporcionados en el presente documento reducen la infección por patógenos que requieren CD46, CD55, CD59 o CD35 para unirse y fijarse a las células. En virtud de los reducidos niveles en la superficie celular de CD46, CD55, CD59 o CD35 sobre células diana, los patógenos tienen una oportunidad reducida de fijarse e invadir las células debido a que la célula diana experimenta menos uniones y contactos con el patógeno.

En una realización a modo de ejemplo, como se describe en el Ejemplo 2, la regulación por disminución de CD46 en células pre-tratadas con Ad35K++ recombinante (SEC ID N°: 5) redujo el nivel de transducción de GFP de infección por viriones de Ad35-GFP en comparación con células de control no tratadas.

Con respecto a poner en contacto las células diana en un sujeto mamífero, a continuación se describen métodos de administración del agente. Con respecto a poner en contacto células cultivadas *in vitro*, métodos de presentación de agentes a células cultivadas son rutinarios y conocidos para expertos habituales en la materia.

La cantidad específica de una composición que comprende polipéptidos modificados variará según varios factores que serán apreciados por aquellos expertos en la materia. Tales factores incluyen el origen de las células diana, el perfil de expresión de CD46, CD55, CD59 o CD35 sobre la superficie de las células diana, el entorno de crecimiento y la accesibilidad de las células, la potencia y estabilidad del agente y la afinidad de unión de los polipéptidos homotrímeros por CD46, CD55, CD59 o CD35.

Células en cultivo, *in vivo*, o *ex vivo* pueden ponerse en contacto con cualquier polipéptido modificado en concentraciones que oscilan de al menos 0,001, 0,0025, 0,005, 0,0075, 0,01, 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20 y 25 µg/ml de medio de cultivo.

Como ejemplo no limitante, como se describe en el Ejemplo 2, las células en cultivo pueden ponerse en contacto con polipéptido del dominio de botón de fibra modificado en concentraciones que oscilan de 0,025 y 25 µg/ml de medio de cultivo.

En algunas realizaciones, la internalización de CD46, CD55, CD59 o CD35 de la superficie de célula diana es detectable en el plazo de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75, o hasta 120 minutos des de la puesta en contacto de la célula diana con el agente que comprende un polipéptido modificado. En algunas realizaciones, los niveles en la superficie celular de CD46, CD55, CD59 o CD35 vuelven a antes del contacto, o los

niveles de pre-incubación, solo después de 24 horas, preferentemente después de 36 horas, más preferentemente después de 48 horas, y más preferentemente después de 72 o incluso 96 horas. Métodos para detectar marcadores de la superficie celular, tales como CD46, CD55, CD59 o CD35, son muy conocidos en la técnica, tales como citometría de flujo y tinción fluorescente. Métodos a modo de ejemplo para detectar los niveles en la superficie celular de CD46 se describen en el Ejemplo 3.

### Métodos para inducir citólisis en una célula diana que expresa a CRP

En otro aspecto, en el presente documento se describen métodos para inducir la citólisis en una célula diana que expresa CD46, CD55, CD59 o CD35 sobre su superficie. El método según este aspecto comprende (a) poner en contacto la célula diana que expresa CD46, CD55, CD59 o CD35 sobre su superficie con una cantidad de un agente que comprende una pluralidad de polipéptidos modificados eficaz para reducir la cantidad de CD46, CD55, CD59 o CD35 presente sobre la superficie de la célula diana; y (b) poner en contacto la célula diana tratada según la etapa (a) con un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a un antígeno sobre la superficie de la célula diana e induce la citólisis.

Se ha mostrado que la expresión de la superficie celular de CD46, CD55, CD59 o CD35 protege a la célula contra la citólisis dependiente del complemento. Según los métodos de este aspecto, la reducción de los niveles de CD46, CD55, CD59 o CD35 de la superficie celular sobre la célula diana sensibiliza a la célula para la citólisis por un agente que induce citólisis dependiente del complemento (CDC), tal como un anticuerpo o fragmento del mismo. En una realización a modo de ejemplo, como se describe en el Ejemplo 2 e ilustra en la FIGURA 2, las células puestas en contacto con una composición que comprende el polipéptido del dominio de botón de fibra de adenovirus modificado Ad35K++ (SEC ID N°: 5) experimentaron una reducción en los niveles de CD46 superficial de hasta el 70 %, durando al menos 48 horas.

Como resultado de la reducción de las funciones inhibitoras del complemento de CD46, CD55, CD59 o CD35, la célula diana se sensibiliza a un agente que se une a un antígeno sobre la superficie de la célula diana o induce de otro modo la citólisis. El agente que se une a la célula diana o induce de otro modo la lisis de la célula puede considerarse un segundo agente terapéutico (siendo el polipéptido modificado capaz de reducir la actividad de una CRP el primer agente terapéutico) y puede ser cualquier agente conocido en la técnica por tener un efecto tal.

En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico está seleccionado del grupo que consiste en una proteína, un polipéptido, una molécula pequeña, un fármaco, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo híbrido, un conjugado de anticuerpo-fármaco, un ARNip, un ARN antisentido, un miARN, un virus y un aptámero. En otras realizaciones, el segundo agente terapéutico está seleccionado del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente citostático, un agente de quimioterapia, un agente de activación del complemento, un modulador de la expresión de CRP, radiación, un agente inmunomodulador, un agente pro-apoptótico, un inhibidor de la proteína de choque térmico, un inhibidor de la proteasa, un agente desialilante, un inhibidor de MMP y un inhibidor de PKC.

En otra realización, el segundo agente terapéutico es: un modulador de la expresión de CRP seleccionado de L11b, IL4 y TGFb1; un inhibidor de la proteína de choque térmico seleccionado de desoxispergualina y geldanamictanoespimicina17-AAG; un inhibidor de la proteasa, agente desialilante o un inhibidor de MMP; un inhibidor de PKC seleccionado de tamoxifeno, enzastaurina y UBN-01; un agente de quimioterapia; o un agente inmunomodulador. Ejemplos de agentes inmunomoduladores incluyen, por ejemplo interferón- $\alpha$ , interferón- $\gamma$ , GM-CSF, un agonista de TLR, un agonista del receptor de NOD, IL2, IL7, IL17, IL21, IL23, TNF, IMiDs, un agonista del receptor de RIG-1, ligando de linfocitos citolíticos espontáneos/agentes de activación, ligandos de NKG2P (por ejemplo, MICa, MICb, RAE1 y ULBP1) y anticuerpos naturales. Un agente de activación de células naturales puede ser un anticuerpo anti-CD137. En algunas realizaciones, el agente puede ser una lectina, o componentes solubles del sistema del complemento, tales como C4b y C3b.

Como se ha descrito anteriormente, en algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico que induce CDC es un anticuerpo, o fragmento del mismo. El anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en aquellos enumerados en la Tabla 1, o más específicamente puede ser Rituxan, Arzerra, Mylotarg, Campath, Herceptin o Avastin. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede modificarse adicionalmente para potenciar adicionalmente activación del complemento, por ejemplo, con una modificación de Fc.

El anticuerpo, o fragmento del mismo, que induce CDC es capaz de (i) unirse a una antígeno de la superficie celular, tal como un marcador de cáncer, y (ii) reclutar el complemento. Por consiguiente, fragmentos de anticuerpos para su uso en los métodos de la invención generalmente retienen el dominio de unión al antígeno y regiones responsables de interactuar con el complemento, que se conocen en la técnica. Por ejemplo, se ha mostrado que regiones de anticuerpos importantes para la inducción de CDC incluyen porciones específicas de la región Fc, específicamente el dominio bisagra (Dall'Acqua, W., et al., *The Journal of Immunology* 177:1129-1138 (2006)) y/o el dominio C<sub>H</sub>2 (Idusogie, E.E., et al., *The Journal of Immunology* 166:2571-2575 (2001)). Como otro ejemplo, estudios de ingeniería de anticuerpos han identificado residuos en el dominio CH2 de la región Fc que potencian la capacidad de rituximab para unirse a C1q y mediar en CDC (Wang, S.Y., et al., *Expert Opin. Biol. Ther.* 8:759-768 (2008)).

En una realización, la célula diana puede estar en contacto continuo con el agente que puede unirse a la célula e inducir la citólisis dependiente del complemento, tal como un anticuerpo, que incluye antes y después de que la célula se ponga en contacto con la composición que comprende polipéptidos modificados. En otra realización, el método puede realizarse en una etapa simultánea. A este respecto, la composición que comprende polipéptidos modificados y el agente que se une a la célula diana e induce la citólisis dependiente del complemento (por ejemplo, un anticuerpo) puede ponerse en contacto con la célula diana a sustancialmente la misma vez. En otra realización más, la célula diana se pone en contacto con el agente que se une a la célula diana e induce la citólisis dependiente del complemento (etapa b) entre aproximadamente 10 minutos y 72 horas después de que la célula diana se ponga en contacto con la composición que comprende polipéptidos modificados (etapa a). Por ejemplo, la etapa b puede realizarse entre aproximadamente 15 minutos y 48 horas después de realizarse la etapa a, y preferentemente entre aproximadamente 15 minutos y 12 horas después de la etapa a. En una realización preferida, la etapa b se realiza aproximadamente 8 horas después de la etapa a.

Puede producirse la citólisis por inducción de una vía del complemento dependiente de anticuerpo, que se describe anteriormente. En realizaciones preferidas, el agente es un anticuerpo monoclonal (mAb), por ejemplo, aquellos anticuerpos a modo de ejemplo de la Tabla 1, conocidos por unirse específicamente a un marcador de la superficie celular sobre la célula diana, tal como un marcador de enfermedad de la superficie celular. Según los métodos proporcionados en el presente documento, la citólisis de células tumorales activada por la señalización del complemento dependiente de anticuerpo también puede implicar la participación de células efectoras. Además de iniciarse la formación de MAC sobre una superficie celular, la inducción de la cascada de señalización del complemento también produce agentes quimiotácticos útiles en reclutar células efectoras que pueden inducir la citólisis mediada por células de la célula cancerosa. Específicamente, la liberación de los componentes del complemento C3a y C5a produce un gradiente que saca células tales como células NK en un tumor. Además, las moléculas de iC3b depositadas sobre la superficie de una célula tumoral activan el receptor 3 del complemento (CR3) sobre la superficie de células efectoras e inducen la citotoxicidad celular dependiente de CR3 en presencia del  $\beta$ -glucano de la pared celular de levadura, proporcionando un posible medio de activación de un mecanismo citotóxico contra células tumorales que normalmente está reservado para levadura y hongos (Adams, G.P. y Weiner, L.M., Nature Biotechnology 23:1147-1157 (2005)).

Según los métodos de este aspecto, el entorno inmediato de la célula diana comprende todos los componentes necesarios del sistema efector del complemento suficientes para producir la citólisis tras la inducción. El término "fuente del complemento", como se usa en el presente documento, se refiere a una mezcla que incluye algunos o todos los componentes individuales del sistema del complemento necesarios para producir la citólisis y muerte celular tras la inducción. Los componentes del sistema del complemento son conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen en el presente documento. Además, es muy sabido que el suero recogido de un animal vertebrado, tal como un ser humano u otro mamífero, es una fuente de todos los componentes del complemento. En algunas realizaciones, el método comprende proporcionar las células diana con una fuente del complemento, tal como suero previamente recogido. Los componentes del sistema del complemento pueden administrarse según métodos conocidos en la técnica, tales como mediante la inyección o infusión de componentes del complemento. En todavía otras realizaciones, el plasma puede ponerse opcionalmente en contacto con células diana que residen en un medio de cultivo de tejido, como se ilustra en el Ejemplo 3. En otras realizaciones, los componentes del complemento se proporcionan por el organismo en el que la célula reside.

En las realizaciones en las que la fuente del complemento se proporciona a las células diana por el usuario del método, el momento preciso de proporcionar la fuente del complemento puede ser variable basándose en las circunstancias. En algunas realizaciones, las células diana pueden ponerse en contacto con una fuente del complemento antes de realizarse la etapa b. En otras realizaciones, las células diana pueden ponerse en contacto con una fuente del complemento simultánea con la realización de la etapa b. En todavía otras realizaciones, las células diana pueden ponerse en contacto con una fuente del complemento posterior a la realización de la etapa b. En realizaciones preferidas, las células diana se proporcionan con una fuente del complemento en el plazo de 30 minutos desde la realización de la etapa b.

En algunas realizaciones, el método sensibiliza a células diana a la CDC inducida por un mAb que se une específicamente a marcadores de la superficie celular para células anormalmente proliferativas, tales como células cancerosas. En este contexto, el uso del término células cancerosas se refiere a células que presentan división celular no regulada o no controlada, y están bien caracterizadas en la materia. Las células cancerosas pueden ser células que residen en el cuerpo de un animal sujeto, o alternativamente, ser células transformadas en un cultivo artificial que presentan capacidad ilimitada para la división celular bajo las condiciones de cultivo apropiadas. Posibles tipos de cáncer incluyen carcinomas (derivados de células epiteliales), sarcomas (derivados de tejido conjuntivo, o células mesenquimatosas), linfoma y leucemias (derivadas de células hemopoyéticas), blastomas (que se derivan de células inmaduras o embrionarias) o cánceres de células germinativas. En otras realizaciones, las células diana son modelos *in vitro* para cáncer, que son fácilmente conocidos para aquellos expertos en la materia. Ejemplos no limitantes incluyen: células de linfoma de Raji-Burkitt (Lapalombella, R., et al., "A Novel Raji-Burkitt's Lymphoma Model for Preclinical and Mechanistic Evaluation of CD52-Targeted Immunotherapeutic Agents", Clinical Cancer Research 14:569-578 (2008)), células BJAB (linfoma de Burkitt negativo para VEB), células Farage (linfoma no Hodgkin de linfocitos B), células Mino (linfoma de células del manto), células Jurkat, K562, HeLa (cuello uterino),

A549 (pulmón), SKOV3 (ovario), HT29 (colon), MDA265MB (mama).

### Métodos para potenciar el efecto antitumoral de un mAb anticancerígeno en un sujeto mamífero

5 Entre los mAb aprobados por la FDA para tumores malignos hematológicos está rituximab (también conocido como Mabthera y Rituxan), que se usa actualmente para el tratamiento de linfoma no Hodgkin de linfocitos B, linfoma de células del manto, leucemia de células pilosas y leucemia linfocítica crónica. Rituximab es un mAb IgG1 sin conjugar humanizado contra CD20. CD20 se expresa sobre la superficie de linfocitos B normales y linfoma de linfocitos B, pero no sobre citoblastos hematopoyéticos, pro-linfocitos B y células del plasma. Estudios *in vitro* e *in vivo* han  
10 mostrado que rituximab es eficaz en inducir la CDC sobre células de linfoma de linfocitos B (Di Gaetano, N., et al., J. Immunol 171:1581-1587 (2003); Golay, J., et al., Haematologica 91:176-183 (2006); Reff, M.E., et al., Blood 83:435-445 (1994); Bellosillo, B., et al., Blood 98:2771-2777 (2001); y, van der Kolk, L.E., et al., British Journal of Haematology 115:807-811 (2001)). La unión de rituximab a células de linfoma mediante CD20 conduce a la activación de la vía del complemento clásica, culminando en la formación de MAC (Di Gaetano, N., et al., J. Immunol 171:1581-1587 (2003)). Se ha informado de una función similar de CDC en la destrucción de células tumorales para ofatumumab (también conocido como HuMax CD20; Arzerra) (un mAb anti-CD20) (Castillo, J., Winer, E., & Quesenberry, P., Experimental Hematology 36:755-768 (2008)), alemtuzumab (un mAb anti-CD52), que se usa para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica (Zent, C.S., et al., Leukemia Research (2008)) y para gemtuzumab (un mAb anti-CD33) usado para el tratamiento de leucemia mieloide aguda (LMA) (Castillo, J., Winer, E., & Quesenberry, P., Experimental Hematology 36:755-768 (2008)).

Rituxan también puede administrarse para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, que incluyen, pero no se limitan a, anemia hemolítica autoinmune, artritis reumatoide y trastornos neurológicos autoinmunitarios (enfermedad de Devic, miastenia grave, neuropatías autoinmunitarias y miopatías inflamatorias).

25 En otro aspecto, la invención proporciona un agente que comprende una pluralidad de polipéptidos del dominio de botón de fibra de adenovirus modificados de la invención, para su uso en un método de potenciar el efecto de un agente terapéutico de anticuerpo en el tratamiento de cáncer, comprendiendo el método (a) administrar al menos una vez al sujeto mamífero una cantidad de una composición que comprende una pluralidad de polipéptidos modificados de la invención y que comprende fenilalanina (Phe) en la posición 242, arginina (Arg) en la posición 279, serina (Ser) en la posición 282 y ácido glutámico (Glu) en la posición 302, eficaz para reducir la cantidad de CD46 presente sobre la superficie de una célula diana; y (b) administrar al menos una vez una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico de anticuerpo al sujeto, en el que el agente terapéutico de anticuerpo se une a un antígeno de superficie de células no CD46 expresado sobre la célula diana.

35 Como se describe en el presente documento, un agente que comprende una pluralidad de polipéptidos modificados sensibiliza a células diana a la CDC inducida por un mAb que se une específicamente a marcadores de la superficie celular de células diana, tal como células cancerosas que residen en el cuerpo de un sujeto mamífero, tal como un ser humano. Los posibles tipos de cáncer incluyen carcinomas (derivados de células epiteliales), sarcomas (derivados de tejido conjuntivo, o células mesenquimatosas), linfoma y leucemias (derivadas de células hemopoyéticas), blastomas (que se derivan de células inmaduras o embrionarias), o cánceres de células germinativas.

45 En algunas realizaciones, el mAb se une específicamente a marcadores de la superficie celular para tumores malignos hematológicos, tales como leucemias, que incluyen, pero no se limitan a, leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC) y leucemia de células pilosas. Los subtipos de LLC incluyen leucemia linfoblástica aguda de precursores B, leucemia linfoblástica aguda de precursores T, leucemia de Burkitt y leucemia bifenotípica aguda. Los subtipos de LLC incluyen leucemia prolinfocítica de linfocitos B. Los subtipos de LMA incluyen leucemia promielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia mielomonocítica aguda y leucemia megacarioblástica aguda. Los subtipos de LMC incluyen leucemia monocítica crónica. Otros tumores malignos hematológicos incluyen mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma de Hodgkin, además de linfoma no Hodgkin, que incluyen linfoma de células del manto, linfoma de células grandes, linfoma folicular, linfoma de linfocitos T, linfoma NK/T, linfoma de Burkitt, linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa (MALTA) y linfoma de células del manto.

55 En algunas realizaciones, el mAb se une específicamente a marcadores de la superficie celular para tumores sólidos, tales como cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de estómago, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer uterino, cáncer de cuello uterino, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer cerebral, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma nasofaríngeo y cáncer de esófago. En algunas realizaciones, el mAb se une específicamente a marcadores de la superficie celular para sarcomas tales como leiomiomas, fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma y sarcoma de Ewing. En algunas realizaciones, el mAb se une específicamente a marcadores de la superficie celular para tumores hematológicos tales como leucemias, linfomas o mielomas.

65 Las células cancerosas son normalmente altamente anormales en comparación con las células de las que se originan. Frecuentemente, las células cancerosas muestran un intervalo de antígenos de la superficie de la célula inusuales que son tanto inapropiados para el tipo de célula, el entorno de la célula, como normalmente están

presentes durante otras etapas del desarrollo del organismo. Alternativamente, los niveles de expresión de proteínas de la superficie celular pueden alterarse en células cancerosas. Por consiguiente, existen diversos marcadores de la superficie celular que pueden identificar únicamente células cancerosas de células normales. Según los métodos proporcionados, marcadores para la enfermedad de células incluyen marcadores para células cancerosas. Los marcadores de células cancerosas pueden incluir proteínas asociadas virales, auto-antígenos de tumor alterados que se expresan a niveles elevados sobre células cancerosas, antígenos específicos de tumor que se expresan exclusivamente sobre células cancerosas (incluyendo versiones mutadas de auto-moléculas). En realizaciones preferidas, el nivel de expresión del marcador es mayor sobre las células cancerosas que en células normales, y más preferentemente, el marcador se expresa casi exclusivamente sobre células cancerosas. Ejemplos no limitantes de marcadores de la superficie celular útiles para células diana cancerosas incluyen: CD3, CD10, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD30, CD33, CD35, CD37, CD38, CD40, CD44, CD52, CD70, CD80, CD133, CD200, receptor 1 del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico (Her2/neu), glóbulo 1 de grasa de leche humana (HMFG1), receptor de interleucina 2 (IL2R), mucina 1 y factores de crecimiento endoteliales vasculares.

Los anticuerpos monoclonales han surgido como una clase prometedora de terapéuticos anticancerígenos. Debido a su capacidad para unirse específicamente a marcadores característicos de células cancerosas, los mAb permiten dirigir los propios sistemas inmunitarios del paciente a la destrucción de las células cancerosas. Anticuerpos monoclonales útiles en los métodos en el presente documento se proporcionan frecuentemente modificados para contener dominios Fc humanos para reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y para potenciar la capacidad para reclutar sistemas efectores inmunitarios humanos. Se contempla que como estos métodos se aplican a sujetos no humanos, los dominios Fc de los anticuerpos pueden modificarse para coincidir con el sujeto. Pueden usarse diferentes isotipos de anticuerpos humanos como el esqueleto de mAb terapéuticos anticancerígenos. Normalmente, la IgM es el isotipo más eficaz para la activación del complemento, sin embargo no se usa ampliamente en oncología clínica debido a que no se extravasa fácilmente de estructuras vasculares (Adams, G.P., y Weiner, L.M., "Monoclonal Antibody Therapy of Cancer", Nature Biotechnology 23:1147-1157 (2005)). Por tanto, la aplicabilidad del isotipo IgM puede estar más limitada a tumores malignos hematológicos. Los isotipos IgG1 e IgG3 son ambos muy eficaces en dirigirse a CDC. Ejemplos no limitantes de anticuerpos mAb anticancerígenos útiles se enumeran en la Tabla 1, y como se describe adicionalmente en Campoli, M., et al., Principle & Practise of Oncology 23(1&2):1-19 (2009), incorporado en el presente documento por referencia.

**Tabla 1: mAb específicos de antígeno tumoral para el tratamiento de cáncer**

Anticuerpo	Isotipo	Objetivo	Indicación de enfermedad
OKT3 (Muromonab)	murino IgG2a	CD3	células T de leucemia linfoblástica aguda; rechazo del trasplante *
Zanolimumab (Hu-Max-CD4)	IgG1 humanizado	CD4	linfomas cutáneos de células T (CTCL), linfoma periférico de células T (CTCL), micosis fungoide (MF)
SGN-19A	IgG1 humanizado	CD19	linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda
Rituximab (Rituxan)	quimérico IgG1	CD20	linfoma de bajo grado*, linfoma difuso de células B*, linfoma folicular*, linfoma no Hodgkin de células B*, el linfoma de células del manto*, leucemia de células peludas*, la leucemia linfocítica crónica*, enfermedades autoinmunes*, el rechazo agudo mediado por anticuerpos de los trasplantes*
Ofatumumab (Arzerra)	IgG1 humanizado	CD20	La leucemia linfocítica crónica (LLC), recaída linfoma folicular no Hodgkin (FL), linfoma difuso de células B
90Y ibritumomab + tiuxetan	murino radiomarcado IgG1	CD20	CD20 (+) linfoma de bajo grado*
131-I tositumomab	murino radiomarcado IgG1	CD20	CD20 (+) linfoma de bajo grado*
Epratuzumab	IgG1 Humanizado	CD22	linfoma no Hodgkin de células B, el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), el linfoma folicular no Hodgkin (FL)

	<b>Anticuerpo</b>	<b>Isotipo</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Indicación de enfermedad</b>
5	Lumiliximab (IDEC-152)	quimérico IgG1-prim humanizado	CD23	leucemia linfoide crónica (LLC)
	Daclizumab (Zenapax)	IgG1 humanizado	CD25	Enfermedad de injerto contra huésped; rechazo agudo de los trasplantes*, leucemia de células T adultas / linfoma, rechazo de aloinjerto renal,
10	Basiliximab (Simulect)	quimérico	CD25	Enfermedad de injerto contra huésped; rechazo agudo de los trasplantes
	HeFi-1	Ratón IgG1	CD30	Linfoma anaplásico de células grandes (LACG); Enfermedad de Hodgkin (HD), CD30 (+) linfoma
15	MDX-060	IgG1 Humanizado	CD30	Linfoma anaplásico de células grandes (LACG); Enfermedad de Hodgkin (HD), CD30 (+) linfoma
	SGN-30	quimérico IgG1	CD30	Linfoma anaplásico de células grandes (LACG); Enfermedad de Hodgkin (HD), CD30 (+) linfoma
20	Lintuzumab	IgG1 humanizado	CD33	leucemia mielode aguda (LMA), síndromes mielodisplásicos (SMD), avanzado MDS
25	Bi213-Hum195	IgG1 Humanizado	CD33	leucemia mielode aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia promielocítica aguda (APML), síndromes mielodisplásicos (MDS)
30	Gemtuzumab + oxogamacin (Mylotarg)	IgG4-conjugado humanizado recombinante para caliqueamicina	CD33	leucemia mielógena aguda*
	TRU-016	IgG1 humanizado	CD37	leucemia linfocítica crónica
35	Dacetuzumab (SGN-40)	IgG1 humanizado	CD40	linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma folicular no Hodgkin (FL)
	Lucatumumab CHIR-12.12	IgG1 humanizado	CD40	Leucemia linfoide crónica (LLC); mieloma múltiple,
40	Alemtuzumab (Campath)	IgG1 humanizado	CD52	leucemia linfocítica crónica*
	SGN-75	IgG1 humanizado	CD70	tumores sólidos, como el cáncer de células renales, enfermedades malignas hematológicas CD70 +
45	Galiximab	quimérico IgG1-prim humanizado	CD80	linfoma folicular, linfoma no Hodgkin de células B
50	Tastuzumab	IgG1 humanizado	HER2/neu	HER2 / neu (+) cáncer de mama*
	Cetuximab	IgG1 quimérico	EGFR	EGFR (+) cáncer de colon*
	Panitumumab	IgG2 totalmente humana	EGFR	EGFR (+) cáncer de colon*
55	Matuzumab	IgG1 humanizado	EGFR	cáncer no escamoso de pulmón no microcítico (CPNM), carcinoma de cabeza y cuello de células escamosas (CECC), cáncer de mama y de páncreas, cáncer de colon (CC)
60	Pertuzumab	IgG1 humanizado	EGFR	CPNM, CECC, CC, cáncer de mama y de ovario
	Ipilimumab (MDX-010)	IgG1 humanizado	CTLA-4	CPNM, RCC, melanoma metastásico
65				

Anticuerpo	Isotipo	Objetivo	Indicación de enfermedad
Tremelimumab (CP-675, 206)	IgG1 humanizado	CTLA-4	CPNM, RCC, melanoma metastásico
Sibrotuzumab	IgG1 humanizado	FAP**	CPNM, CC
DR-4-specific mapatumumab (TRM-1, HGS-ETR1)	IgG1 humanizado	TRAIL	NSCLC, CC, cáncer de ovario, mieloma múltiple
DR-5-specific lexatumumab (HGS-ETR2, TRA-8)	IgG1 humanizado	TRAIL	tumores sólidos
Cantuzumab mertansine	Humanizado IgG1-maitansinoide	CanAg***	CC, cáncer pancreático
Bevacizumab (Avastatin)	IgG1 humanizado	factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	cáncer de colon*, cáncer no escamoso de pulmón no microcítico (CPNM)*, cáncer de mama metastásico*
Apolizumab (Hu1D10)	IgG1 humanizado	HLA-DR	Células B no Hodgkin, leucemia linfóide crónica de (LLC); leucemia linfoblástica aguda (LLA); leucemia mieloide aguda (AML); , Enfermedad de Hodgkin de Waldenstrom,
Milatumzumab	IgG1 humanizado	HLA-DR	Células B no Hodgkin, leucemia linfóide crónica de (LLC); mieloma múltiple,
* Existe aprobación de la actual FDA para la enfermedad indicada ** FAP es un tipo II glicoproteína de membrana que pertenecen a la familia de genes de la proteasa de serina que se encuentra en las líneas celulares de sarcoma. *** CanAg es una glicofoma de mucina asociado a células (MUC1) que se encuentra en la mayoría de cáncer páncreas, biliar y colorrectal.			

La capacidad de cualquier anticuerpo para inducir CDC sobre una célula depende de su capacidad para reclutar C1q, un constituyente del primer componente del complemento. C1q se une al dominio C<sub>H</sub>2 de moléculas de Ig. Pueden incorporarse modificaciones en los mAb que potencian su eficacia para reclutar el complemento e inducir CDC sobre la célula diana. Por ejemplo, se han identificado dos residuos dentro del dominio C<sub>H</sub>2 que potencian la inducción de CDC por rituximab (Idusogie, E.E., et al., The Journal of Immunology 166:2571-2575 (2001)). Específicamente, Idusogie et al., muestran que sustituciones en las posiciones de aminoácidos K326 y E333 potenciaron la unión de C1q al anticuerpo, produciendo elevada actividad de CDC. En Dall'Acqua, W., et al., The Journal of Immunology 177:1129-1138 (2006), los investigadores se involucraron en análisis sistemáticos de las características funcionales de una región bisagra de IgG1 humana en el contexto de interacciones con activación del complemento. Se diseñaron mutaciones dirigidas para aumentar o disminuir la flexibilidad de la bisagra, o aumentar o disminuir la longitud de la bisagra. Los investigadores encontraron que la pérdida de rigidez de la bisagra central es perjudicial para la unión de C1q, mientras que la pérdida de rigidez en la bisagra superior tuvo efecto mínimo o no tuvo. Además, se identificaron varias sustituciones en la bisagra superior que potenciaron la fijación del complemento, que indica una función influyente de esta bisagra.

En algunas realizaciones, el agente que comprende una pluralidad de polipéptidos modificados comprende además moléculas o dominios adicionales que potencian la eficacia de un anticuerpo monoclonal anticancerígeno. Por ejemplo, moléculas o dominios adicionales puede disminuir la inmunogenicidad. En una realización, el agente comprende además uno o más cadenas de polietilenglicol (PEG). Las cadenas de PEG conjugadas con polipéptidos terapéuticos pueden proporcionar diversas ventajas, tales como elevado tamaño para reducir la filtración de agente en el riñón, para enmascarar epítopes antigénicos, aumentar la solubilidad del agente debido a la hidrofobia de PEG y reducida accesibilidad del agente para enzimas proteolíticas y anticuerpos. Así, la terapia puede potenciarse mediante la PEGilación por elevada retención del agente en el cuerpo, una reducción de la inmunogenicidad del agente y elevada estabilidad del agente. Está madurando la química de PEGilación y se conocen una variedad de cadenas de PEG con atributos variables. También se conocen estrategias para llevar a cabo la PEGilación mientras que se preserva la actividad del agente. Para una revisión, véase Veronese, F.M., y Pasut, G., Drug Discovery Today 10:1451-1458 (2005).

**Dosificaciones y vías de administración**

El agente que comprende una pluralidad de polipéptidos modificados puede administrarse al sujeto antes, simultáneamente o después de la administración del anticuerpo terapéutico, por ejemplo, el anticuerpo anticancerígeno.

5 El momento preciso de las administraciones del anticuerpo anticancerígeno con respecto al agente que comprende una pluralidad de polipéptidos modificados puede variarse para lograr el mayor efecto antitumoral. Éste pueden determinarse, por ejemplo, administrando la composición que comprende polipéptidos modificados, recogiendo periódicamente las células diana y determinando el nivel de la superficie celular de la CRP. Un ejemplo de este enfoque se describe en el Ejemplo 3 para CD46. Idealmente, el mAb anticancerígeno se administra en un momento para garantizar que su contacto con la célula diana se corresponde con los niveles más bajos de CD46 superficial. Por ejemplo, el mAb anticancerígeno puede administrarse antes de, simultáneamente con, después de cada administración de la composición que comprende polipéptidos modificados. En algunas realizaciones, el mAb anticancerígeno puede administrarse antes de la administración del agente, por ejemplo hasta 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, 40 horas, 42 horas, 48 horas, 54 horas, 60 horas, 66 horas, 72 horas, 78 horas, 84 horas, 90 horas, o incluso hasta 96 horas antes de la administración del agente. A este respecto, el momento preciso de administración podría explicar la semivida del mAb anticancerígeno. Por ejemplo, rituximab se conoce por tener una semivida de aproximadamente 40 horas. Por tanto, el agente que comprende un polipéptido modificado puede no administrarse más de 40 horas después de la administración de rituximab.

En otras realizaciones, el mAb anticancerígeno puede administrarse simultáneamente con o hasta 96 horas después de una administración del agente, tal como entre aproximadamente 10 minutos y 72 después de la administración del agente, o hasta 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, 40 horas, 42 horas, 48 horas, 54 horas, 60 horas, 66 horas, 72 horas, 78 horas, 84 horas, 90 horas, o incluso hasta 96 horas después de la administración del agente. Por ejemplo, el mAb anticancerígeno puede administrarse entre aproximadamente cinco horas y 48 horas después de cada administración de la composición que comprende polipéptidos modificados.

Un ejemplo no limitante de momento preciso se ilustra en el Ejemplo 2, en el que rituximab se administra a células ocho horas después de la administración de una composición que comprende polipéptidos del dominio de botón de fibra modificados (Ad35K++, SEC ID N°: 5). Otro ejemplo no limitante se ilustra en el Ejemplo 3, en el que rituximab se administra a ratones diez horas después de la administración de una composición que comprende polipéptidos del dominio de botón de fibra modificados (Ad35K++).

Las vías y métodos de administración del agente y anticuerpo son variables y pueden adaptarse apropiadamente a la afección que está tratándose. La administración puede ser sistémica o local. Vías de administración sistémicas incluyen intramuscular, subcutánea, intravenosa, intrarterial, inhalacional, sublingual, bucal, tópica, transdérmica, nasal, rectal y vaginal.

La dosificación eficaz de la composición que comprende polipéptidos modificados varía dependiendo de factores tales como la edad del sujeto, peso, altura, sexo, afección médica general e historia médica. Dosificaciones a modo de ejemplo establecidas en el presente documento se proporcionan en mg de agente por kilogramo de sujeto que recibe la dosificación. Como una ilustración, las composiciones que comprenden polipéptidos modificados pueden administrarse en intervalos de dosificación entre 0,01 y 250 mg/kg, preferentemente entre 0,1 y 10 mg/kg, y más preferentemente entre 0,10 y 0,5 mg/kg. Las dosificaciones de mAb anticancerígeno aprobado son fácilmente identificables por los profesionales médicos. Por ejemplo, las dosificaciones de muchos mAb anticancerígenos pueden oscilar de 2-250 mg/kg del sujeto en necesidad. Sin embargo, tratamientos experimentales con rituximab, un mAb anti-CD20, para el tratamiento de LLC han incluido hasta 2250 mg/kg (O'Brien, S.M., et al., Journal of Clinical Oncology 19:2165-2170 (2001)).

Las administraciones de la composición que comprende polipéptidos modificados pueden repetirse para potenciar el resultado terapéutico. El momento preciso de la posterior administración puede ser variable. En una realización, la posterior administración de una composición que comprende polipéptidos modificados se realiza después de tiempo suficiente para permitir que los niveles de CD46, CD55, CD59 o CD35 vuelvan a los niveles previos sobre células supervivientes. En una realización a modo de ejemplo, basándose en datos *in vitro* que implican Ad35++, este periodo de tiempo puede ser superior a 48 horas después de la administración previa de la composición que comprende polipéptidos del dominio de botón de fibra de adenovirus modificados. En otra realización, el periodo de tiempo puede ser 72 horas después de la administración previa de la composición que comprende polipéptidos modificados, o incluso más. En otras realizaciones, el momento preciso de cualquier administración posterior se determina por los protocolos de dosificación establecidos del mAb usado en el método.

En algunas realizaciones del método, múltiples administraciones de la composición que comprende polipéptidos modificados se llevan a cabo sin inducir en el sujeto una reacción inmunológica adversa que interfiera con el efecto antitumoral del método. Según tales realizaciones, la composición que comprende polipéptidos del dominio de botón de fibra de adenovirus modificados carece de epítopes de linfocitos T o B reconocidos por el sistema inmunitario del sujeto, y así deja de estimular cualquier respuesta inmunitaria tras una segunda administración o posterior, o

anticuerpos producidos contra los polipéptidos del dominio de botón de fibra de adenovirus modificados no reducen la eficacia de la terapia. Como se describe en el Ejemplo 4, la administración intravenosa de polipéptidos del dominio de botón de fibra de adenovirus modificados recombinantes (Ad35K++) no produjo anticuerpos detectables contra los polipéptidos recombinantes en un sujeto mamífero.

Como se describe en el Ejemplo 6, pueden predecirse los posibles epítopes de proteínas de botón de fibra recombinantes modificadas. Los residuos de aminoácidos de estos posibles epítopes pueden someterse a mutagénesis dirigida al sitio según métodos muy conocidos en la técnica en un esfuerzo por reducir la inmunogenicidad de los polipéptidos. Por ejemplo, pueden administrarse variantes a animales inmunocompetentes y pueden determinarse fácilmente títulos de anticuerpos resultantes. En otro enfoque, pueden seleccionarse variantes producidas en una biblioteca de mutagénesis, como se describe en el presente documento, por la falta de inmunogenicidad.

El diseño de mAb anticancerígenos y otros terapéuticos está bastante avanzado para los fines de reducir la inmunogenicidad. La mayoría de los mAb disponibles incorporan dominios Fc humanos que no estimulan respuestas inmunitarias. Los mAb quiméricos están normalmente compuestos de regiones variables murinas, que reconocen las dianas, fusionadas sobre regiones constantes humanas, que ayuda a evitar las respuestas inmunitarias humanas contra el mAb. Estos anticuerpos normalmente son aproximadamente el 65 % humanos. Los mAb humanizados se producen usando solo la región hipervariable murina, produciendo un anticuerpo que es aproximadamente el 95 % humano. Finalmente, pueden producirse anticuerpos monoclonales humanos en ratones transgénicos o bibliotecas de expresión en fago.

### Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, en el presente documento se describen composiciones para reducir la actividad, los niveles en la superficie celular o la densidad de CD46, CD55, CD59 o CD35. Según este aspecto, las composiciones comprenden (a) una cantidad de un agente eficaz para reducir los niveles en la superficie celular de CD46, CD55, CD59 o CD35, comprendiendo la composición una pluralidad de polipéptidos modificados, en la que los polipéptidos modificados pueden formar homotrímeros que tienen afinidad potenciada por la unión a CD46, CD55, CD59 o CD35 en comparación con homotrímeros formados a partir de polipéptidos por lo demás sin modificar, por ejemplo, aquellos polipéptidos sin modificar que consisten en SEC ID N°: 3 (dominio de botón de fibra de Ad35 no mutante); y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones que comprenden polipéptidos modificados pueden administrarse a un sujeto en necesidad de las mismas, a dosis terapéuticamente eficaces para tratar o mejorar afecciones asociada a la expresión de la superficie celular de CD46, CD55, CD59 o CD35.

Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de las composiciones que comprenden polipéptido modificado suficiente para producir mejora de los síntomas de la afección. Composiciones a modo de ejemplo que comprenden un polipéptido modificado se describen en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición comprende además al menos un agente que induce citólisis dependiente del complemento, tal como un anticuerpo anticancerígeno o fragmento del mismo, como se describe en el presente documento.

La toxicidad y eficacia terapéutica de las composiciones que comprenden polipéptidos modificados pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales empleando modelos animales experimentales, tales como el modelo de linfoma de xenoinjerto murino descrito en el Ejemplo 3, en el que  $3 \times 10^6$  células Raji se inyectan en la vena de la cola de ratones CB17 SCID inmunodeficientes. Usando tales modelos animales, el NOAEL (nivel de efectos adversos no observados) y la MED (la dosis mínimamente eficaz) pueden determinarse usando métodos convencionales. La relación de dosis entre los efectos de NOAEL y MED es la relación terapéutica, que se expresa como la relación NOAEL/MED. Composiciones que comprenden polipéptidos modificados que presentan grandes relaciones terapéuticas o índices son las más preferidas. Pueden usarse los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales en la formulación de un intervalo de dosificaciones para su uso en seres humanos. La dosificación de las composiciones que comprenden polipéptidos modificados se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la MED con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada.

Para cualquier formulación de compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse usando modelos animales. Por ejemplo, puede formularse una dosis en un modelo animal para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante que incluye la MED. También pueden medirse niveles cuantitativos de las composiciones que comprenden polipéptidos modificados en plasma, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución.

Generalmente, la dosificación de composiciones administradas que comprenden las composiciones descritas varía dependiendo de factores tales como la edad del sujeto, peso, altura, sexo, afección médica general e historia médica previa. Como una ilustración, las composiciones que comprenden polipéptido del dominio de botón de fibra de adenovirus modificado, tal como Ad35K++ (SEC ID N°: 5), pueden administrarse en intervalos de dosificación de aproximadamente 0,01 a 250,0 mg/kg, preferentemente 0,1 a 10,0 mg/kg, más preferentemente 0,10 a 0,5 mg/kg del peso corporal del sujeto.

La eficacia terapéutica de las composiciones que comprenden polipéptido modificado y métodos relacionados en un sujeto dado, y dosificaciones apropiadas, puede determinarse según ensayos muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, pueden realizarse estudios de supervivencia y la cuantificación de células cancerosas diana por citometría de flujo usando modelos animales después de la administración de composiciones que comprenden polipéptido modificado, como se describe en el Ejemplo 3. La eficacia terapéutica de composiciones que comprenden polipéptido modificado en sujetos humanos puede determinarse por ensayos muy conocidos en oncología. Por ejemplo, el tamaño de las lesiones tumorales puede monitorizarse cuantitativamente por exploración física y estudios radiológicos, que incluyen, pero no se limitan a, el uso de TAC, rayos X, IRM y ultrasonidos. Las células tumorales en la sangre y médula ósea pueden cuantificarse por métodos microscópicos y/o inmunológicos rutinarios. Puede monitorizarse el suero para la presencia y/o niveles de marcadores de cáncer. Ejemplos de marcadores del suero indicativos de cáncer incluyen picos de anticuerpo monoclonal en mieloma múltiple, CA-125 en cáncer de ovario, niveles de alfa-fetoproteína en cáncer testicular y cáncer de hígado, y gonadotropina coriónica humana en coriocarcinoma. La orina también puede monitorizarse para indicadores de enfermedad, tales como la presencia y/o nivel de cadenas ligeras en orina puede ser indicativa de mieloma múltiple.

Similarmente, los agentes descritos en el presente documento pueden evaluarse para la posibilidad de administraciones repetidas empleando modelos animales de laboratorio experimentales, tales como ratones C57B1/6 transgénicos para CD46 línea MCP8B, como se describe en el Ejemplo 4. Animales inmunocompetentes pueden evaluarse para la generación de respuestas inmunitarias contra los agentes descritos en el presente documento después de que recibir agentes según un programa de vacunación estándar conocido en la técnica. Además, los agentes pueden ensayarse contra suero humano para determinar la presencia de anticuerpos anti-agente. Preferentemente, las composiciones que comprenden polipéptidos modificados provocan respuesta inmunitaria mínima o ninguna del paciente. Sin embargo, independientemente de la generación de anticuerpos, composiciones preferidas que comprenden polipéptidos modificados retendrán la capacidad de reducir los niveles en la superficie celular de CD46, CD55, CD59 o CD35 tras administraciones repetidas.

#### **Vehículos farmacéuticos**

En general, las composiciones proporcionadas que comprenden polipéptidos modificados, combinadas con cualquier otro agente terapéutico seleccionado, están adecuadamente contenidas en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo es no tóxico, biocompatible y está seleccionado de manera que no afecte perjudicialmente la actividad biológica de las composiciones que comprenden polipéptidos modificados (y cualquier otro agente terapéutico combinado con los mismos). Vehículos farmacéuticamente aceptables a modo de ejemplo para péptidos se describen en la patente de EE.UU. nº 5.211.657 a Yamada. Las composiciones que comprenden polipéptidos modificados útiles en la invención pueden formularse en preparaciones en formas sólidas, semi-sólidas, de gel, líquidas o gaseosas tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, disoluciones, supositorios, inhalantes e inyecciones, que permiten la administración oral, parenteral o quirúrgica.

Vehículos adecuados para administración parenteral mediante inyectable, infusión o irrigación y administración tópica incluyen agua destilada, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, disoluciones de Ringer normal o con lactato, disolución de dextrosa, disolución de Hank o propanodiol. Además, pueden emplearse aceites no volátiles estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin puede emplearse cualquier aceite biocompatible que incluya mono- o diglicéridos sintéticos. Además, ácidos grasos, tales como ácido oleico, se usan en la preparación de inyectables. El vehículo y agente pueden combinarse como un líquido, suspensión, gel polimerizable o no polimerizable, pasta o pomada.

El vehículo también puede comprender un vehículo de administración para sostener (es decir, prolongar, retardar o regular) la administración del (de los) agente(s) o para potenciar la administración, captación, estabilidad o farmacocinética del (de los) agente(s) terapéutico(s). Un vehículo de administración tal puede incluir, a modo de ejemplo no limitante, micropartículas, microesferas, nanoesferas o nanopartículas compuestas de proteínas, liposomas, hidratos de carbono, compuestos orgánicos sintéticos, compuestos inorgánicos, hidrogeles poliméricos o copoliméricos, y micelas poliméricas. Sistemas de administración de hidrogel y de micelas adecuados incluyen los copolímeros de PEO:PHB:PEO y complejos de copolímero/ciclodextrina desvelados en la publicación internacional nº WO 2004/009664 A2, y los complejos de PEO y PEO/ciclodextrina desvelados en la publicación de EE.UU. nº 2002/0019369 A1. Tales hidrogeles pueden inyectarse localmente en el sitio de acción previsto, o subcutáneamente o intramuscularmente para formar un depósito de liberación sostenida.

Para administración intratecal (IT) o intracerebroventricular (ICV), sistemas de administración apropiadamente estériles (por ejemplo, líquidos; geles, suspensiones, etc.) pueden usarse para administrar los agentes y composiciones proporcionados. Para administración por vía oral de agentes no peptidérgicos, las composiciones que comprenden polipéptido modificado pueden soportarse en una carga o diluyente inerte tal como sacarosa, almidón de maíz o celulosa.

Las composiciones de la presente invención también pueden incluir excipientes biocompatibles, tales como agentes dispersantes o humectantes, agentes de suspensión, diluyentes, tampones, potenciadores de la penetración,

emulsionantes, agentes de unión, espesantes, aromatizantes (para administración por vía oral).

Más específicamente con respecto a las composiciones que comprenden polipéptidos modificados, formulaciones a modo de ejemplo pueden administrarse parenteralmente como dosificaciones inyectables de una disolución o suspensión del compuesto en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como agua, aceites, solución salina, glicerol o etanol. Adicionalmente, sustancias auxiliares tales como humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias de tamponamiento del pH y similares puede estar presentes en las composiciones que comprenden polipéptidos modificados. Componentes adicionales de las composiciones farmacéuticas incluyen petróleo (tal como de origen animal, vegetal o sintético), por ejemplo, aceite de soja y aceite mineral. En general, glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol son vehículos líquidos preferidos para disoluciones inyectables.

Las composiciones que comprenden polipéptidos modificados también pueden administrarse en forma de una inyección de liberación prolongada o preparación de implante que puede formularse de tal manera que permita una liberación sostenida o pulsada de los agentes activos.

### Administración

Las composiciones farmacéuticas que comprenden polipéptidos modificados pueden administrarse de varias formas dependiendo de si un modo de administración local o sistémico es o no el más apropiado para la condición que está tratándose.

Como se usa en el presente documento, el término "administración sistémica" pretende incluir, pero no se limita a, vías orales y parenterales que incluyen intramuscular (IM), subcutánea, intravenosa (IV), intrarterial, inhalacional, sublingual, bucal, tópica, transdérmica, nasal, rectal, vaginal, y otras vías de administración que producen eficazmente la dispersión del agente administrado a un único sitio o múltiples sitios de acción terapéutica previstos. Vías preferidas de administración sistémica para las presentes composiciones incluyen intravenosa, intramuscular, subcutánea e inhalacional. Se apreciará que la vía de administración sistémica exacta para los agentes seleccionados utilizados en composiciones particulares de la presente invención se determinará en parte para explicar la susceptibilidad del agente a las vías de transformación metabólica asociadas a una vía de administración dada. Por ejemplo, agentes peptidérgicos pueden ser administrados lo más adecuadamente por vías distintas de la oral.

Pueden administrarse composiciones que comprenden polipéptidos modificados a un sujeto en necesidad de las mismas por cualquier medio adecuado. Métodos de administración de tales agentes incluyen administración por vías de administración oral, pulmonar, parenteral (por ejemplo, inyección intramuscular, intraperitoneal, intravenosa (IV), o subcutánea), inhalación (tal como mediante una formulación en polvo fino), transdérmica, nasal, vaginal, rectal o sublingual, y pueden formularse en formas de dosificación apropiadas para cada vía de administración.

A modo de ejemplo representativo, las composiciones que comprenden polipéptidos modificados pueden introducirse en un cuerpo vivo por aplicación a una membrana corporal que puede absorber los polipéptidos, por ejemplo, las membranas nasales, gastrointestinales y rectales. Los polipéptidos normalmente se aplican a la membrana absorbente conjuntamente con un potenciador de la permeación (véase, por ejemplo, Lee, V.H.L., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* 5:69, 1988; Lee, V.H.L., *J. Controlled Release* 13:213, 1990; Lee, V.H.L., Ed., *Peptide and Protein Drug Delivery*, Marcel Dekker, New York (1991); DeBoer, A.G., et al., *J. Controlled Release* 13:241, 1990.) Por ejemplo, STDHF es un derivado sintético de ácido fusídico, un tensioactivo esteroideo que es similar en estructura a las sales biliares y se ha usado como potenciador de la permeación para administración nasal. (Lee, W.A., *Biopharm.* 22, Nov./Dic. 1990.)

Las composiciones que comprenden polipéptidos modificados pueden introducirse en asociación con otra molécula, tal como un lípido, para proteger los polipéptidos de la degradación enzimática. Por ejemplo, se ha usado la unión covalente de polímeros, especialmente polietilenglicol (PEG), para proteger ciertas proteínas de la hidrólisis enzimática en el cuerpo y así prolongar la semivida (Veronese, F.M., y G. Pasut, "PEGylation, successful approach to drug delivery", *Drug Discovery Today* 10:1451-1458, (2005)). Se han informado muchos sistemas poliméricos para la administración de proteínas (Bae, Y.H., et al., *J. Controlled Release* 9:271, 1989; Hori, R., et al., *Pharm. Res.* 6:813, 1989; Yamakawa, I., et al., *J. Pharm. Sci.* 79:505, 1990; Yoshihiro, I., et al., *J. Controlled Release* 10:195, 1989; Asano, M., et al., *J. Controlled Release* 9:111, 1989; Rosenblatt, J., et al., *J. Controlled Release* 9:195, 1989; Makino, K., *J. Controlled Release* 12:235, 1990; Takakura, Y., et al., *J. Pharm. Sci.* 78:117, 1989; Takakura, Y., et al., *J. Pharm. Sci.* 78:219, 1989).

Recientemente, se han desarrollado liposomas con estabilidad en suero y semividas en circulación mejoradas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.741.516, a Webb). Además, se han revisado diversos métodos de preparaciones de liposomas y de tipo liposoma como posibles vehículos de fármaco (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.567.434, a Szoka; la patente de EE.UU. nº 5.552.157, a Yagi; la patente de EE.UU. nº 5.565.213, a Nakamori; la patente de EE.UU. nº 5.738.868, a Shinkarenko; y la patente de EE.UU. nº 5.795.587, a Gao).

Las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden administrarse sistémicamente periódicamente a intervalos determinados para mantener un nivel deseado de efecto terapéutico. Por ejemplo, las composiciones pueden administrarse, tal como mediante inyección intravenosa, cada dos a cuatro semanas o a intervalos menos frecuentes. La pauta de dosificación se determinará por el médico considerando diversos factores que pueden influir en la acción de la combinación de agentes. Estos factores incluirán el grado de progreso de la afección que está tratándose, la edad del paciente, sexo y peso, y otros factores clínicos. La dosificación para cada agente individual variará en función de la composición que comprende polipéptidos modificados que se incluyen en la composición, además de la presencia y naturaleza de cualquier vehículo de administración de fármaco (por ejemplo, un vehículo de administración de liberación sostenida). Además, la cantidad de dosificación puede ajustarse para explicar la variación en la frecuencia de administración y el comportamiento farmacocinético del (de los) agente(s) administrado(s).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende (a) un polipéptido modificado de la invención; y (b) un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a un antígeno sobre la superficie de una célula de mamífero e induce la citólisis dependiente del complemento. Polipéptidos modificados para su uso en los kits se describen en el presente documento, tales como, por ejemplo, un polipéptido del dominio de botón de fibra modificado que comprende SEC ID N°: 5. Anticuerpos o fragmentos de los mismos a modo de ejemplo para su uso en los kits también se describen en el presente documento, por ejemplo, como se proporciona en la Tabla 1.

En una realización específica, en el presente documento se describe un kit que comprende (a) un polipéptido del dominio de botón de fibra modificado que comprende al menos 12 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 3, en el que el polipéptido incluye al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Asp207Gly, Thr245Ala e Ile256Leu, o una combinación de las mismas, y en el que el polipéptido puede formar homotrímeros que pueden unirse a CD46; y (b) un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a un antígeno sobre la superficie de una célula de mamífero e induce la citólisis. Polipéptidos del dominio de botón de fibra modificados para su uso en los kits se describen en el presente documento, tales como, por ejemplo, un polipéptido del dominio de botón de fibra modificado que comprende SEC ID N°: 5. Anticuerpos o fragmentos de los mismos a modo de ejemplo para su uso en los kits también se describen en el presente documento, por ejemplo, como se proporciona en la Tabla 1.

En otro aspecto, en el presente documento se describen métodos de potenciar el efecto de un agente terapéutico de anticuerpo en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto mamífero. Los métodos según este aspecto comprenden: (a) administrar al menos una vez al sujeto mamífero una cantidad de un agente que comprende una pluralidad de polipéptidos modificados eficaz para reducir la cantidad o densidad de CD46, CD55, CD59 o CD35 presente sobre la superficie de una célula diana; y (b) administrar al menos una vez una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico de anticuerpo al sujeto, en el que el agente terapéutico de anticuerpo se une a un antígeno de la superficie celular no CD46, CD55, CD59 o CD35 expresado sobre la célula diana. Polipéptidos modificados para su uso en este aspecto de los métodos se describen en el presente documento. Polipéptidos modificados adicionales para su uso en este aspecto pueden derivarse usando mutagénesis rutinaria y métodos de cribado, tales como los métodos descritos en el Ejemplo 1.

Según los métodos de este aspecto, la reducción de los niveles de CD46, CD55, CD59 o CD35 de la superficie celular sobre la célula diana sensibiliza a la célula diana, tal como un linfocito B o linfocito T a citólisis por un agente terapéutico de anticuerpo que induce citólisis dependiente del complemento (CDC), tal como un anticuerpo o fragmento del mismo. Como se describe en el Ejemplo 8, se mostró que Ad35K++ potenciaba la citólisis de linfocitos B primarios por rituximab. Como se ha demostrado adicionalmente en el Ejemplo 8, el tratamiento con Ad35K++ (SEC ID N°: 5) de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) desencadenó la eliminación de CD46 de la superficie celular.

Como se describe en el presente documento, una composición que comprende una pluralidad de polipéptidos modificados, por ejemplo, una pluralidad de polipéptidos del dominio de botón de fibra modificados, sensibiliza a células diana a la CDC inducida por un mAb que se une específicamente a marcadores de la superficie celular de células diana, tales como linfocitos T o linfocitos B que residen en el cuerpo de un sujeto mamífero, tal como un ser humano. Los métodos según este aspecto pueden usarse para potenciar el efecto terapéutico de un agente terapéutico de anticuerpo usado para tratar una enfermedad autoinmunitaria tal como aquellas nombradas en el presente documento con agente que se une a un antígeno de la superficie celular sobre un linfocito B (por ejemplo, CD20) o un agente que se une a un antígeno de la superficie celular sobre un linfocito T (por ejemplo, CD25 o CD4).

Los métodos de este aspecto pueden usarse para tratar una enfermedad autoinmunitaria agotando linfocitos B y/o T diana, tales como, por ejemplo, artritis reumatoide, diabetes, trastornos de la tiroides, esclerosis múltiple, rechazo mediado por anticuerpos de un órgano trasplantado, nefropatía membranosa idiopática, psoriasis, neuropatía disimmune (es decir, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, polimiositis, dermatomiositis, neuropatía motora multifocal o gammapatía monoclonal), miastenia grave, paquimeningitis aséptica, enfermedad inflamatoria del intestino y anemia hemolítica autoinmune (AHAI).

Por ejemplo, se ha utilizado rituximab (mAb anti-CD20) para tratar las siguientes enfermedades autoinmunitarias:

artritis reumatoide (Owczarczyk, K., et al., *Ann Rheum Dis* 67:1648-1649 (2008); esclerosis múltiple (Petereit, H., et al., *Mult Scler* 15:189-192 (2009); rechazo mediado por anticuerpos de un órgano trasplantado (Yang, Y.W., et al., *Exp Clin Transplant* 6:211-214 (2008); nefropatía membranosa idiopática (Kuppachi, S., et al., *J. Nephrol* 22(4):561-4 (2009); neuropatías disímunes (Argyriou, A.A., *Mol Med* 15(7-8):283-7 (2009); miastenia grave (Nelson, P.P., et al., *J Clin Neuromuscul Dis* 10(4):170-7 (2009); polimiositis, dermatomiositis, paquimeningitis aséptica (Schmid, L., et al. *Arthritis Rheum* 60(6):1632-4 (2009); y anemia hemolítica autoinmune (AHA) (Annicchiarico, B.E., et al., *Transplant Proc.* 41(4):1380-2 (2009).

Se sabe que los trastornos linfoproliferativos y autoinmunitarios comparten la desregulación monoclonal y la ventaja de supervivencia de linfocitos B (véase Castillo, J., et al., *Expert Opin Investig Drugs* 18(4):491-500 (2009). Se sabe que CD20 se expresa en linfocitos B y la modulación de linfocitos B con anticuerpos monoclonales que se unen a CD20 tal como rituximab se ha usado para tratar tanto enfermedades linfoproliferativas como trastornos autoinmunitarios. Se apreciará por aquellos expertos en la materia que los métodos descritos en el presente documento para administrar una composición que comprende una pluralidad de polipéptidos modificados para sensibilizar linfocitos B diana a la CDC inducida por un mAb que se une específicamente a marcadores de superficie de linfocitos B (por ejemplo, CD20) de células diana no se limitan a tratamientos con rituximab (anti-CD20), y pueden aplicarse a sensibilizar células a la CDC en el contexto de otros mAb anti-CD20, tales como ofatumumab (mAb anti-CD20, conocido de otro modo como Arzerra, GlaxoSmithKline), como se muestra en la Tabla 1.

También se apreciará por aquellos expertos en la materia que los métodos descritos en el presente documento que puede usarse para sensibilizar linfocitos T diana a la CDC inducida por un mAb que se une específicamente a marcadores de la superficie de linfocitos T (por ejemplo, CD25 o CD4) de linfocitos T diana pueden llevarse a cabo por, pero no se limitan a, el uso de daclizimab (mAb anti-CD25) o zanolimumab (mAb anti-CD4), como se muestra adicionalmente en la Tabla 1.

Los siguientes ejemplos simplemente ilustran el mejor modo ahora contemplado para poner en práctica la invención, pero no debe interpretarse que limiten la invención.

#### **EJEMPLO 1**

Este ejemplo describe la producción de proteínas de botón de fibra de Ad35 mutantes con elevada afinidad para unirse a CD46.

#### ***Creación de bibliotecas mutantes de botón de fibra de Ad35***

Se realizó PCR mutagénica al azar en el ADN que codifica el dominio de botón de fibra de adenovirus 35 (SEC ID N°: 1) según el protocolo previamente descrito por Wang, H., et al. *Journal of Virology* 81:12785-12792 (2007). Específicamente, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio de proteína del botón de fibra de Ad35, correspondiente a los aminoácidos 123 a 320 de la secuencia de longitud completa, se obtuvo por amplificación por PCR de ADN de Ad35 no mutante (SEC ID N°: 1) usando los cebadores P1 (5'-TTTAAGGATCCGGTGACATTTGTATAAAGGATAG-3') (SEC ID N°: 10) y P2 (5'-TATATAAGCTTAGTTGTCGTCTTCTGTAAT-3') (SEC ID N°: 11).

Los productos de PCR se clonaron en pQE30 (Qiagen, Valencia, CA) para la expresión en *Escherichia coli* con un marca de His<sub>6</sub> del extremo N.

Se realizó PCR mutagénica al azar, optimizada para lograr en promedio una o dos mutaciones de aminoácidos por polipéptido del dominio de botón de fibra. La PCR se realizó usando los siguientes reactivos: 20 fmoles de molde de ADN de pQE-Ad35knob, 30 pmoles de cebador de PCR Pmut1 (5'-CGTCAGCACGGATCCGGTGACATTTGTATAAAGGATAGTATTAACACCTT ATGGACTGGA-3') (SEC ID N° 12), 30 pmoles de cebador de PCR Pmut2 (5'-CCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTAGTTGTCGTC-3') (SEC ID N° 13), 10X tampón mutagénico (2,5 µl, 3,5 µl, 5 µl, o 10 µl; MgCl<sub>2</sub> 70 mM, KCl 500 mM, Tris 100 mM [pH 8,3 a 25 °C] y 0,1 % [peso/vol] de gelatina), 10 µl de MnCl<sub>2</sub> 5 mM, 10 µl de mezcla de trifosfatos de desoxinucleósido (dGTP 2 mM, dATP 2 mM, dCTP 10 mM y dTTP 10 mM) y 5 unidades de *Taq* polimerasa (Promega, Madison, WI). Los reactivos se mezclaron en un volumen final de 100 µl. Las condiciones de los ciclos fueron 94 °C durante un minuto, 45 °C durante un minuto y 72 °C durante un minuto durante 30 ciclos. Los productos de PCR mutantes (645 pb) se purificaron, se digirieron con enzimas de restricción apropiadas y se clonaron en el vector pQE100 (Qiagen).

#### ***Cribado de la biblioteca de mutantes de botón de fibra de Ad35 para mutantes con elevada afinidad de unión por CD46***

La biblioteca de plásmidos mutantes de botón de fibra de Ad35 se transformó en células de *E. Coli*, cepa huésped M15, y se sembró sobre placas de agar de Luria-Bertani (placa maestra) con kanamicina y ampicilina. Se cultivaron de aproximadamente 800 a aproximadamente 1.000 colonias por placa de Petri de 15 cm. Después del crecimiento durante la noche, una membrana de filtración Durapore de 0,45 µm de tamaño de poro (Millipore, Billerica, MA) se colocó encima de las colonias. La membrana se desprendió y se colocó cuidadosamente, con las colonias hacia

arriba, sobre dos hojas de papel Whatman 3MM impregnado en medio de Luria-Bertani complementado con antibióticos e IPTG 1 mM (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido) para inducir la expresión transgénica de proteínas en las colonias. Después de la incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente (TA), el filtro con las colonias se colocó encima de un filtro de nitrocelulosa y un papel Whatman 3MM impregnado en tampón de lisis nativo (Tris 20 mM-Cl, pH 8, NaCl 300 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0,1 mg/ml de lisozima, 0,75 mg/ml de DNasa 1 y la mitad de un comprimido de mezcla de inhibidores de la proteasa libre de EDTA completo/10 ml [Roche, Palo Alto, CA]). El "sándwich de filtro" se congeló-descongeló cuatro veces durante 10 minutos a -80 °C y 10 minutos a 30 °C. La membrana de nitrocelulosa se sacó del sándwich y se bloqueó con 3 % de albúmina de suero bovino en TBS (Tris 10 mM-Cl, pH 7,5, NaCl 150 mM) a 4 °C durante la noche. A continuación, las membranas se incubaron con CD46 recombinante soluble (sCD46), producida como se describe previamente en Wang, H., et al., Journal of Virology 81:12785-12792 (2007), en TBS y 3 % de leche durante una hora a TA y a continuación se lavaron tres veces durante diez minutos en tampón TBS-0,05 % de Tween 20 (TBS-T). A continuación, la transferencia se incubó con anticuerpo anti-CD46 (clon J4.48; Fitzgerald, Concord, MA) (dilución 1:50) en TBS y 3 % de leche durante una hora a TA y a continuación se lavó tres veces durante diez minutos en tampón TBS-T. Para visualizar la unión, la transferencia se incubó con anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulina de ratón (Ig)-peroxidasa de rábano picante (BD Pharmingen, San Jose, CA) (dilución 1:1.000) en TBS y 3 % de leche durante una hora a TA, se lavó y se sometió a sustrato de ECL (Pierce, Rockford, IL). De las 10.000 colonias sembradas, se recogieron las 20 colonias con la unión más intensa a CD46 de las placas maestra originales. Se secuenció el ADN de plásmido de estas colonias. De las 20 colonias recogidas y secuenciadas, 16 colonias contuvieron siete secuencias de botón de fibra distintas que codifican sustituciones únicas o combinadas de aminoácidos en los residuos Asp270, Thr245 o Ile256, como se muestra más adelante en la Tabla 2.

#### **Análisis de resonancia de plasmones superficiales (SPR)**

Las proteínas mutantes de botón de fibra de Ad35 recombinantes codificadas por cada secuencia de ADN mutante se produjeron en *E. coli* y se purificaron por cromatografía de afinidad por Ni-ácido nitrilotriacético. Las uniones de las proteínas de botón de fibra recombinantes purificadas a CD46 soluble se verificó por análisis de transferencia Western como se describe en Wang, H., et al. Journal of Virology 81:12785-12792 (2007) (datos no mostrados). Descrito brevemente, se separaron proteínas de botón de fibra recombinantes por electroforesis en gel de poliacrilamida y luego se transfirieron sobre membranas de nitrocelulosa. Las muestras de proteína se cargaron en tampón de carga (Tris 50 mM-Cl, pH 8,0, ditiotreitól 100 mM, 2 % de dodecilsulfato de sodio, 10 % de glicerol, 0,2 % de azul de bromofenol) con y sin ebullición. La transferencia se incubó con sCD46 y posteriormente anticuerpo anti-CD46, y la unión se visualizó como se ha descrito anteriormente en el contexto de cribado de la biblioteca de mutantes de botón de fibra de Ad35. Todas las proteínas de botón de fibra mutante recombinantes que produjeron *E. coli* espontáneamente formaron trímeros, como se ha determinado por análisis con electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones no desnaturalizantes y se confirmó por la unión de anticuerpo anti-His<sub>6</sub>-HRP policlonal de conejo (ab1187-100, lote 134173; Abcam, Cambridge, MA) (datos no mostrados), que reconoce botón de fibra de Ad35 solo como trímero (véase Wang, H., et al., Journal of Virology 81:12785-12792 (2007)).

La afinidad de unión de cada proteína de botón de fibra mutante recombinante por sCD46 se determinó comparando las resonancias de plasmones superficiales con aquellas de una proteína de botón de fibra de Ad35 no mutante y una proteína de botón de fibra de Ad35 que contuvo una sustitución de Arg279Cys, produciendo la supresión de la unión de CD46, como se ha descrito previamente en Wang, H., et al., Journal of Virology 81:12785-12792 (2007). Descrito brevemente, las proteínas de botón de fibra de Ad35 se biotinilaron usando un kit EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce) según las instrucciones del fabricante. Los productos biotinilados se acoplaron a chips sensores recubiertos de estreptavidina (Biacore, Piscataway, NJ) por inyección manual hasta que se obtuvieron los valores requeridos para las unidades de resonancia (UR). Se inyectaron diversas concentraciones de sCD46 sobre la superficie activada hasta que se lograron las densidades superficiales deseadas. A continuación, las superficies acopladas activadas se inactivaron de sitios reactivos con etanolamina 1 M (pH 8) durante 3 a 5 minutos. Todos los datos se recogieron a 1 Hz usando dos inyecciones duplicadas para cada concentración de analito. Todos los análisis se llevaron a cabo en un instrumento Biacore T100 a una velocidad de flujo de 30  $\mu$ l/ml en HBS-EP (Biacore). Para eliminar completamente las cantidades restantes de sCD46 unida a la superficie del chip sensor, la superficie del chip sensor se regeneró después de cada ciclo mediante inyección de glicina 10 mM-HCl, pH 3. El procesamiento de datos y el análisis cinético se realizaron usando el software de evaluación Biacore T100.

La  $K_D$  (constante de equilibrio de disociación) de la proteína de botón de fibra no mutante (SEC ID N°: 3) fue 14,64 nM, mientras que las  $K_D$  para los mutantes de botón de fibra con las sustituciones de un único aminoácido Asp207Gly, Thr245Ala e Ile256Leu fueron 1,77, 7,64, y 10,96 nM, respectivamente, como se muestra más adelante en la Tabla 2. Esto se traduce en afinidades 8,3, 1,9 y 1,3 veces superiores a las de la proteína de botón de fibra no mutante. La mayoría de los mutantes de botón de fibra identificados contuvieron dos o tres de las sustituciones anteriormente enumeradas. La mayor afinidad ( $K_D$  de 0,63; 23,2 veces superior a la del Ad35 no mutante) fue la de un mutante de botón de fibra con una doble sustitución de Asp207Gly, Thr245Ala (es decir, polipéptido SEC ID N°: 5). Dos de los mutantes de botón de fibra identificados con múltiples mutaciones tuvieron la sustitución Asn217Asp o Thr226Ala; sin embargo, cuando se analizaron individualmente, estas sustituciones no habían influido sobre la afinidad del botón de fibra (datos no mostrados). Las constantes de asociación y las constantes de disociación del no mutante y todos los mutantes de botón de fibra se muestran en la Tabla 2. Las cinéticas de asociación para toda las

proteínas de botón de fibra probadas son comparables. Sin embargo, las constantes de disociación se correlacionaron inversamente con las afinidades de botón de fibra. Esto indica que los mutantes de proteína de botón de fibra con mayor afinidad se disocian más lentamente de CD46 que la proteína de botón de fibra de Ad35 no mutante.

5

**Tabla 2: Análisis de resonancia de plasmones superficiales (SPR) de mutantes de botón de fibra de Ad35<sup>a</sup>**

Ad35 botón de fibra mutante <sup>b</sup>	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (nM)
tipo salvaje Ad35	1.52X106	0.0234	14.64
Asp207Gly	3.51X106	0.0034	1.77
Thr245Ala	2.25X106	0.0173	7.64
Ile256Leu	2.13X106	0.0236	10.96
Asp207Gly + Thr245Ala	2.48X106	0.0017	0.63
Asp207Gly+Thr226Ala	1.97X106	0.0026	1.41
Asn217Asp + Thr245Pro + Ile256Leu	2.25X106	0.0097	4.82
Asp207Gly + Thr245Ala + Ile256Leu	1.96X106	0.0018	0.92
<sup>a</sup> Ka, constante de velocidad de asociación ( $K_{on}$ ); Kd, constante de velocidad de disociación ( $K_{off}$ ); KD, constante de velocidad de disociación en equilibrio.			
<sup>b</sup> Otros botenes de fibra mutantes Ad35 distintos al de tipo salvaje se muestran por la referencia a las mutaciones contenidas en cada proteína, en el que el primer residuo de aminoácido corresponde al residuo de tipo salvaje en la posición designada y el segundo residuo de aminoácido corresponde al residuo sustituido en el polipéptido mutado.			

25

### 30 **Modelado de las interacciones entre polipéptidos del dominio de botón de fibra de Ad35 mutantes y CD46**

En un intento por entender la base estructural del aumento de la afinidad de los mutantes de botón de fibra por CD46, las estructuras cristalinas de las proteínas de botón de fibra de Ad35 se superpusieron con la de CD46. La estructura cristalina de la proteína de botón de fibra de Ad35 no mutante se obtuvo previamente (véase Wang et al. J. Virol. 81:12785-12792 (2007)), y las estructuras cristalinas de los mutantes recién generados se generaron según el mismo protocolo. Particularmente, las proteínas de botón de fibra de Ad35 mutantes marcadas con His<sub>6</sub> del extremo N se produjeron en *E. coli* y se purificaron por afinidad por Ni-ácido nitrilotriacético y cromatografía de filtración en gel y se dializaron contra Tris 20 mM-HCl (pH 8,0), NaCl 200 mM y ditiotreitól 5 mM. La proteína se cristalizó usando juegos de cribado por cristalización NeXtal DWBlock. Los cristales crecieron a 21 °C en 30 % de polietilenglicol 1000 y MgBr<sub>2</sub> 0,2 M (pH 8,0). Se recogieron conjuntos de datos nativos de las líneas de haces BL13B1 y BL13C1 del National Synchrotron Radiation Research Center en Taiwán, usando un detector con dispositivo de carga acoplada ADSC Quantum, y se procesaron con el software HKL2000 (Otwinowski, Z., y W. Minor, pp. 307-326). En Carter, C., y Sweet, R. (eds.) Methods in Enzymology: Macromolecular Crystallography, Academic Press, San Diego, CA. (1997)). La estructura se resolvió por sustitución molecular con el programa Open-EMPR (Kissinger, C., et al., Acta Crystallographer D57:1474-1479 (2001)) usando la cabeza Ad3 (entrada de Protein Data Bank [PDB] 1h7z) como modelo de búsqueda. El modelo se reconstruyó usando el programa O (Jones, T., et al., Acta Crystallographer A47:110-119 (1991)) y se refinó usando el programa CNS con el objetivo de máxima probabilidad y optimización automática del peso (Brunger, A., et al., Acta Crystallographer D54:905-921 (1998)). La estructura cristalina de CD46 se obtuvo de Persson, et al., Nat. Struct. Mol. Biol. 14:164-166 (2007).

50

Con respecto al mutante de Asp207Gly, el residuo Ile13 hidrófobo de CD46 es el grupo R de aminoácidos más próximo a Asp207, estando su grupo hidroxilo 5,93 y 4,4 angstroms de los grupos metilo Ile más próximos. Aunque no se desea ceñirse a teoría particular alguna, una sustitución de Asp207Gly puede permitir que el bucle DE de Ad35 (SEC ID N°: 6) aproxime CD46 más estrechamente a Ile13 debido a que, a diferencia del residuo de Asp polar, la glicina es hidrófoba (carece de una cadena lateral). Posteriormente, el bucle HI (SEC ID N°: 8) también se acercaría más a CD46.

55

Con respecto al mutante de Thr245Ala, el modelo de unión de Ad35-CD46 original indica que el residuo Thr246 de Ad35 interactúa con el residuo Tyr67 de CD46 y es importante para la unión. En esta conformación, el grupo hidroxilo del residuo Thr245 cercano de Ad35 está relativamente próximo al grupo carbonilo del esqueleto e hidroxilo del grupo R del residuo Thr64 de CD46 (4,35 y 5,21 angstroms) y al grupo carbonilo e hidroxilo del grupo R del residuo Glu63 de CD46 (4,46 y 5,76 angstroms). Aunque el grupo hidroxilo del residuo Thr245 no está suficientemente próximo para formar un fuerte enlace de hidrógeno con cualquiera de estos grupos, la proximidad de los grupos probablemente influye en la conformación del bucle en esta región. De nuevo, aunque no se desea ceñirse a teoría particular alguna, la introducción de alanina hidrófoba en esta posición (Thr245Ala) puede hacer la interacción Thr246 a Tyr67 más fuerte, ya que el bucle FG (SEC ID N°: 7) pueden moverse más próximo a CD46.

60

65

Con respecto al mutante de Ile256Leu, el residuo Ile256 de Ad35 está orientado hacia el núcleo central del trímero de fibra en el centro de la hoja G y su grupo R hidrófobo está más próximo al grupo carboxilo polar en la cadena lateral de Asn271 dentro de la hoja H. De nuevo, aunque no se desea ceñirse a teoría particular alguna, el modelo sugiere que los grupos metilo de Leu256 están más próximos a Asn271 que aquellos de Ile256, aún cuando se desconozca la rotación de la leucina en el mutante de Ile256Leu. La elevada repulsión probablemente separaría más las hojas G y H. Aunque no se desea ceñirse a teoría particular alguna, se cree que la mayor afinidad de la proteína de botón de fibra de Ad35 que contiene la mutación de Ile256Leu por CD46 puede ser debida a la elevada estabilidad del trímero de botón de fibra.

En resumen, se identificaron proteínas mutantes de botón de fibra recombinantes con elevada afinidad de unión por CD46.

## **EJEMPLO 2**

Este ejemplo demuestra que la incubación de células tumorales con Ad35K++ mutante (Asp207Gly y Thr245Ala) elimina CD46 de la superficie de células tumorales.

### ***Base teórica***

Varios estudios preclínicos han mostrado que las células tumorales pueden sensibilizarse a la citólisis dependiente del complemento (CDC) inducida por rituximab por anticuerpos bloqueantes para CD55 y/o CD59 (Ziller, F., et al., *European Journal of Immunology* 35:2175-2183 (2005); y Guo, B., et al., *Clinical Immunology* 128:155-163 (2008)). Sin embargo, además de bloquear la activación del complemento, CD55 y CD59 también participan en la activación de linfocitos T (Hamann, J., et al., *European Journal of Immunology* 28:1701-1707 (1998); Deckert, M., Kubar, J., y Bernard, A., *J. Immunol.* 148:672-677 (1992)). Esto puede dar a células tumorales que pierden estas dos proteínas una ventaja selectiva en escapar de la destrucción inmunomediada y puede explicar por qué CD55 y CD59 están frecuentemente ausentes en tumores (Hara, T., et al., *Br. J. Haematol.* 82:368-373 (1992)). Se ha propuesto que CD46 sola puede proteger células tumorales de la lisis del complemento (Madjd, Z., et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 54:149-156 (2005)). De acuerdo con esta teoría, la reducción de la expresión de CD46 usando oligonucleótidos antisentido fue capaz de sensibilizar células tumorales a la CDC inducida por rituximab, demostrando una función predominante de CD46 en la protección de células tumorales contra CDC (Zell, S., et al., *Clinical and Experimental Immunology* 150:576-584 (2007)). CD46 se expresa uniformemente a altos niveles en muchos tumores malignos (Rushmere, N.K., et al., *International Journal of Cancer* 108:930-936 (2004); Varela, J.C., et al., *International Journal of Cancer* 123:1357-1363 (2008)), que incluye tumores malignos hematológicos (Hara, T., et al., *Br. J. Haematol.* 82:368-373 (1992)).

Se llevó a cabo un experimento para determinar si la proteína de botón de fibra de Ad35 mutante (Ad35K++) con afinidad potenciada por CD46 regularía por disminución CD46 sobre células tumorales y convertiría las células tumorales en susceptibles a la CDC.

### ***Materiales y métodos***

**Producción de proteína de botón de fibra:** Se seleccionaron proteínas de botón de fibra de Ad35 modificadas recombinantes con elevada afinidad por CD46 de una biblioteca de expresión en *E. coli* como se describe en el Ejemplo 1. Las proteínas de botón de fibra mutantes recombinantes se produjeron en *E. coli* con marcas del extremo N de seis residuos de histidina consecutivos (6-HIS) y se purificaron por cromatografía en agarosa Ni-NTA como se describe en el Ejemplo 1. Las proteínas de botón de fibra se dializaron contra Hepes 20 mM, NaCl 200 mM, 17 % de glicerol. Se realizaron pruebas de endotoxina usando el kit de prueba de lisado de amebocitos de *Limulus* de Cape Cod Inc. (E. Falboca, MA).

**Células:** Se cultivaron líneas celulares 293 (Microbix, Toronto, Ontario, Canadá) y HeLa (Colección Americana de Cultivos Tipo, ATCC) en medio Eagle modificado con Dulbecco (DMEM) complementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS) y con L-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Se cultivaron células Raji (linfoma de Burkitt humano) (ATCC CCL-86), Mino (linfoma de células del manto) (ATCC CRL-300), Farage (linfoma no Hodgkin de linfocitos B) (ATCC CRL-2630) y BJAB (linfoma de Burkitt negativo para VEB) (obtenido de Edward A. Clark, Universidad de Washington) en RPMI complementado con 10 % de FBS y con L-glutamina/ (Pen-Estrep).

Se obtuvieron células primarias de leucemia linfocítica crónica (B-LLC) de sangre periférica de pacientes después del consentimiento informado. El diagnóstico de LLC se basó en inmunofenotipo, morfología de los linfocitos y las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Se aislaron células mononucleares por centrifugación sobre Lymphoprep (Nycomed Pharm, Oslo, Noruega). En promedio, el 96 % (intervalo 91-98 %) de las células aisladas de pacientes con LLC pertenecieron al clon leucémico como se ha determinado por co-expresión de CD5, CD19 y CD20 en análisis de citometría de flujo. Las células B-LLC descongeladas se cultivaron en medio RPMI 1640 que contenía 10 % de FCS, piruvato de sodio 2 mM, Hepes 2 mM, 2-mercaptoetanol 100 µM, 100 unidades/ml de penicilina, 100

µg/ml de estreptomycin, L-glutamina 2 mM. Dos días después de la congelación, las células de LLC se usaron para el experimento.

**Anticuerpos:** Se obtuvo rituximab de Genentech, Inc. (South San Francisco, CA). Se obtuvo Daclizumab de Roche Pharmaceuticals (Nutley, NJ). Se obtuvieron FITC-ratón anti-CD20 humana (clon 2H7) y FITC-ratón anti-CD46 humana (clon E4.3) de BD Pharmingen (San Jose, CA). Se obtuvo anticuerpo para CD46 conjugado con PE (clon E4.3) de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Se obtuvo anticuerpo bloqueante para CD46 sin conjugado (clon MEM-258) de AbD Serotec (Raleigh, NC). Se obtuvo anticuerpo anti-marca de His (IgG1 monoclonal de ratón, nº 34660) de Qiagen (Valencia, CA).

**Medición de los niveles en la superficie celular de CD46:** Los niveles de CD46 sobre superficies celulares se midieron del siguiente modo. Se enfriaron células en suspensión (Mo7e, Raji, etc.) sobre hielo durante 45 minutos y a continuación se incubaron con 20 µg/ml de proteína de botón de fibra de Ad35 no mutante recombinante (denominada Ad35K no mutante), proteína de botón de fibra de Ad35 mutante con sustituciones de Asp207Gly y Thr245Ala (denominada Ad35K++) o anticuerpo de ratón anti-CD46 humana (MEM-258, AbD Serotec) en 100 µl de volumen sobre hielo durante 1 hora. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS frío que contenía 2 % de FBS y se incubaron con medio fresco a 37 °C. En los momentos de tiempo indicados, las células se lavaron y se incubaron con anticuerpo anti-CD46 humano conjugado con ficoeritrina (PE) (clon E4.3, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) 1:20 en 100 µl de volumen durante una hora sobre hielo. Después de lavar tres veces, la intensidad media de fluorescencia de la PE se analizó inmediatamente por citometría de flujo (descrita más adelante). Las células HeLa incubadas con 20 µg/ml de Ad35K, Ad35K++, o anticuerpo anti-CD46, se lavaron y se transfirieron a 37 °C durante los periodos de tiempo indicados. Después de la incubación, las células HeLa se desprendieron por verseno y se analizaron por citometría de flujo como se describe más adelante.

**Inmunofluorescencia:** Se marcaron proteínas de botón de fibra recombinantes Ad35K (no mutantes) y proteína mutante Ad35K++ con fluorocromo Cy3 (colorante CyTM Bis-Reactive de Amersham, GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) según el protocolo del fabricante. Se sembraron células tumorales ( $2 \times 10^4$  células/pocillo) en portaobjetos de vidrio de ocho cámaras en medio de crecimiento estándar un día antes del experimento. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS y se incubaron con 20 µg/ml de Cy3-proteínas de botón de fibra de Ad35 en 200 µl de medio durante una hora a 37 °C. Las células se lavaron dos veces con PBS y se movieron a una estufa de incubación de 37 °C/5 % de CO<sub>2</sub>. En los momentos de tiempo indicados, las células se lavaron con PBS y se fijaron con fijador frío (acetona y metanol 1:1) durante 15 minutos a 4 °C. Las células fijadas se incubaron primero con 2 % de leche desnatada durante 20 minutos para bloquear la unión no específica de anticuerpos. Se añadió anticuerpo anti-CD46 monoclonal (1:100, Fitzgerald, Concord, MA) y se incubó durante la noche a 4 °C. Después de lavar dos veces con PBS, las células se incubaron con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (1:200, Molecular Probes, Eugene, OR) durante 30 minutos. Después de lavar, los portaobjetos se montaron con Vectashield que contiene DAPI (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). Se tomaron fotografías en un microscopio confocal Zeiss META usando una lente de aceite de 40X.

**Citometría de flujo:** Se desprendieron células HeLa mediante tratamiento con verseno y se lavaron tres veces con tampón de lavado frío en hielo (PBS que contiene 2 % de FBS). Las células de linfoma cultivadas en suspensión se lavaron tres veces con tampón de lavado. Después de lavar,  $2 \times 10^5$  células se resuspendieron en 100 µl de tampón de lavado incubado con anticuerpos específicos sobre hielo durante una hora. A continuación, las células se lavaron dos veces y se analizaron por duplicado por citometría de flujo.

**Estudios de infección de Ad35:** El vector Ad35-GFP se ha descrito previamente (Gao, W., y Gambotto, A., en prensa (2008)). Se purificó Ad35-GFP por ultracentrifugación en gradientes de CsCl. La relación de partículas virales con respecto a unidades formadoras de placa fue 15:1. Para los estudios de transducción,  $2 \times 10^5$  células HeLa se incubaron con PBS o 20 µg/ml de proteína de botón de fibra Ad35K (no mutante), Ad35K-279 mutante (unión a CD46 reducida) o mutante Ad35K++ (unión a CD46 elevada) en 200 µl de medio a temperatura ambiente durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con medio fresco a 37 °C. Después de 72 horas de incubación, las células se infectaron con Ad35-GFP a MOE de 25, 50, 100, 200, 400 y 800 ufp/célula. Se lavaron los medios que contenían virus dos horas después de infección. Veinticuatro horas después de la infección, la expresión de GFP se analizó por citometría de flujo.

**Ensayos de viabilidad in vitro:** Se sembraron  $5 \times 10^4$  células Raji/pocillo por triplicado en placas de 96 pocillos con RPMI complementado con 10 % de FBS inactivado por calor, y se preincubaron con (1) PBS, (2) 25 µg/ml de anticuerpo para CD46 (MEM-258, Serotec), (3) 25 µg/ml de botón de fibra de Ad35 mutante Arg279Cys, (4) 25 µg/ml de Ad35K no mutante, o (5) 25 µg/ml de Ad35K++ mutante con alta afinidad por CD46. Ocho horas después, se añadieron 15 µg/ml de rituximab a las células y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió suero humano normal (NHS) como fuente del complemento y las células se incubaron a 37 °C durante otras tres horas para la lisis (se añadió volumen total hasta 150 µl). Se usaron las siguientes diluciones de NHS; para células Raji (5 % de NHS), para BJAB (20 % de NHS), para Farage (10 % de NHS) y para B-LLC primarias (25 % de NHS). Las células viables en cada pocillo se contaron después de la tinción con azul de tripano. Cada muestra se llevó a cabo por triplicado y cada pocillo se contó cuatro veces. Se realizaron tres estudios independientes.

**Transferencias Western:** Se cargaron proteínas de botón de fibra recombinantes o hexona (0,5 ug/carril) en tampón de carga (Tris 50 mM-HCl, pH 6,8, ditiotretitol 100 mM, 2 % de dodecilsulfato de sodio, 10 % de glicerol, 0,2 % de azul de bromofenol) sin desnaturalización. Se hirvieron partículas virales de Ad5 ( $1 \times 10^9$  pv/carril) durante cinco minutos en tampón Laemmli. Las proteínas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida. Los geles tanto se tiñeron con azul de Coomassie como se transfirieron sobre membranas de nitrocelulosa. Los filtros se incubaron con suero humano o de ratón (1:100 diluido en PBS). La unión de IgG humana se desarrolló con anticuerpo de cabra anti-IgG humana-peroxidasa de rábano picante (HRP) (Millipore, Billerica, MA). La unión de IgG de ratón se detectó con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón-HRP (BD Pharmingen) (1:1000) en PBS y 3 % de leche en polvo durante 1 hora a TA. Los filtros se lavaron tres veces durante 10 minutos en tampón TBS-T y se sometieron a sustrato de quimioluminiscencia potenciado (Pierce, Rockford, IL).

## Resultados

### **La incubación de células tumorales con Ad35K++ mutante (Asp207Gly y Thr245Ala) elimina CD46 de la superficie de las células tumorales**

El nivel de CD46 sobre la superficie de células HeLa se midió en diferentes momentos de tiempo después de añadir 20 µg/ml de proteína de botón de fibra Ad35K recombinante (no mutante; SEC ID N°: 3) o mutante Ad35K++ (Asp207Gly + Thr245Ala; SEC ID N°: 5) al medio de cultivo usando citometría de flujo con un anticuerpo anti-CD46 que no interfirió con la interacción entre la proteína de botón de fibra de Ad35 y CD46. Como se muestra en la FIGURA 2A, en el plazo de 15 minutos después de añadir Ad35K o Ad35K++, los niveles de CD46 disminuyeron aproximadamente el 70 % en comparación con células de control tratadas con PBS. No se observó disminución en los niveles de CD46 con una proteína de botón de fibra de Ad35 que se suprimió para la unión de CD46 (Ad35K-279 mutante) (véase Wang, H., et al., Journal of Virology 81:12785-12792 (2007)). A diferencia, como se muestra adicionalmente en la FIGURA 2A, la incubación con un mAb anti-CD46 produjo solo una disminución del 30 % de los niveles de CD46 con un regreso más rápido a los niveles de pre-incubación. Además, esta disminución del 30 % observada de los niveles de CD46 puede producirse parcialmente por interferencia entre los mAb anti-CD46 "efectores" y "detectores", aún cuando se dirigieron contra diferentes epítopes. Además de la disminución de CD46 de superficie, se observaron menos proteínas de botón de fibra Ad35K unida a célula (no mutante) y mutante Ad35K++ en estudios de citometría de flujo, como se muestra en la FIGURA 2B, que indica que CD46 y los botones de fibra de Ad35 se recogen juntos. No se encontraron señales asociadas a célula para Ad35K-279 (datos no mostrados).

Los estudios de inmunofluorescencia para CD46 y proteínas de botón de fibra de Ad35 recombinantes corroboraron adicionalmente el hallazgo de menos CD46 superficial en células tratadas con Ad35K (no mutante) y con mutante Ad35K++ en comparación con células incubadas con Ad35K-279. Se observó que 30 minutos después de añadir proteínas de botón de fibra recombinantes se encontró más Ad35K++ que Ad35K dentro de las células (datos no mostrados). La proteína Ad35K (no mutante) y mutante Ad35K++ junto con CD46 se detectaron en endosomas/lisomas tardíos con anticuerpos para el marcador catepsina B (datos no mostrados). 12 horas después de añadir proteínas de botón de fibra recombinantes, las células tratadas con Ad35K++ demostraron tinción de CD46 predominantemente citoplásmica, mientras que pareció que la señal de CD46 global fue inferior a antes de la incubación con mutante Ad35K++ recombinante, que indica degradación de complejos de CD46/Ad35K++ internalizados en lisomas (datos no mostrados).

Además de los estudios de citometría de flujo usando mAb anti-CD46 para evaluar el efecto de proteínas de botón de fibra de Ad35 recombinantes sobre los niveles de CD46 superficial, se realizaron estudios de transducción con un vector de Ad35 que expresa GFP (Ad35-GFP) que usa CD46 como receptor de unión para la infección. Estudios previos han mostrado que la transducción con vectores que contienen fibra de Ad35 se correlaciona directamente con la densidad de CD46 sobre la superficie celular (Anderson, et al., Cancer Res. 64:4919-4926 (2004)). Se incubaron células HeLa con proteínas de botón de fibra de Ad35 recombinantes y mAb anti-CD46. 72 horas después, cuando los ligandos de CD46 ya no fueron detectables sobre la superficie celular, las células se infectaron con MOE crecientes de Ad35-GFP. Como se muestra en la FIGURA 2C, las células HeLa incubadas con Ad35K++ fueron relativamente resistentes a la infección por Ad35-GFP durante un gran intervalo de MOI (5 a 1.000 ufp/célula). Los niveles de expresión de GFP fueron >1000 veces inferiores en células tratadas con Ad35K++ mutante, en comparación con células incubadas con Ad35K-279.

Además de células HeLa, también se realizaron estudios de citometría de flujo de CD46 y de transducción de Ad35-GFP en otras líneas de células tumorales, que incluyen células Mo7e de eritroleucemia y células Raji de linfoma B. En todas las líneas celulares analizadas, se observó la eliminación transitoria de CD46 de la superficie celular tras la incubación con proteínas Ad35K (no mutantes) o mutantes Ad35K++ (datos no mostrados).

### **La incubación de células de linfoma con Ad35K++ mutante (Asp207Gly y Thr245Ala) las sensibiliza a la citólisis dependiente del complemento mediada por rituximab**

Se realizó un estudio con cultivos de linfoma de linfocitos B establecido y primario para probar si la incubación con proteína Ad35K (no mutante) o mutante Ad35K++ los haría más susceptibles a la citólisis dependiente del

complemento (CDC) mediada por rituximab. Se realizaron experimentos iniciales con células Raji, una línea de células de linfoma de Burkitt humano positivas para CD20. Los estudios de citometría de flujo mostraron niveles de CD46 altos y relativamente uniformes sobre la superficie celular de estas células, que indica una posible resistencia a CDC. En particular, los niveles de CD20 sobre células Raji variaron más (aproximadamente dos órdenes de magnitud). Como se muestra en la FIGURA 3, la incubación de células Raji con rituximab seguido de suero humano normal (NHS), como fuente del complemento, produjo la destrucción de aproximadamente el 70 % de células Raji en el plazo de de tres horas. Es de notar que las restantes células Raji viables tuvieron niveles de CD20 que fueron aproximadamente 50 veces menores que el nivel de fluorescencia medio de CD20 de la población de control (sin rituximab o sin NHS) (datos no mostrados). Para probar la especificidad de la CDC mediada por rituximab para células de linfomas positivas para CD20, se usó el mAb humanizado daclizumab que se une a CD25 (que no se expresa sobre células Raji) (datos no mostrados). No se observó destrucción de células significativas mediada por este anticuerpo cuando se combinó con NHS (FIGURA 3). Además, se observó que la incubación de células HeLa (que no poseen niveles superficiales de CD20 detectables) con rituximab/NHS no condujo a destrucción de células significativa (datos no mostrados).

Para probar si la eficacia de CDC mediada por rituximab podría aumentarse por la internalización mediada por Ad35K++ de CD46, se incubaron células Raji con mutante Ad35K-279 (unión reducida), Ad35K (no mutante) y mutante Ad35K++ (elevada afinidad de unión) durante ocho horas. Como se muestra en la FIGURA 3, el pretratamiento con Ad35K no mutante y Ad35K++ mutante aumentó la destrucción de células con rituximab/NHS, aproximadamente 2 y 10 veces, respectivamente, en comparación con rituximab/NHS solo. Se observó el efecto sensibilizante de Ad35K++ a dosis de tan solo 25 ng/ml y concentraciones que oscilan de 25 ng/ml a 25 µg/ml produjeron niveles similares de sensibilización a CDC. Ad35K-279 no tuvo efecto sobre la destrucción mediada por rituximab/NHS. La pre-incubación de células Raji con mAb anti-CD46, seguido de la incubación con rituximab/NHS, produjo significativamente menos destrucción de células mediada por rituximab que la pre-incubación con Ad35K (no mutante) o Ad35K++ mutante (mAb anti-CD46 frente a Ad35K:  $p=0,024$ ). La incapacidad del mAb anti-CD46 para potenciar la CDC mediada por rituximab, en comparación con Ad35K y Ad35K++, es probable que sea un resultado de la incapacidad de los mAb para reticular varias moléculas de CD46. La incubación de células Raji con ligandos de CD46 (mAb anti-CD46, Ad35K, o Ad35K++) junto con NHS (solo o en combinación con daclizumab) provocó una disminución de ~30 % en la viabilidad celular, lo más probablemente como resultado de CDC cuando CD46 se bloquea (FIGURA 3).

Para extender estos hallazgos a otras líneas celulares positivas para CD20, se realizaron experimentos adicionales sobre las siguientes células positivas para CD20: BJAB (linfoma de Burkitt negativo para VEB), Farage (linfoma no Hodgkin de linfocitos B) y Mino (linfoma de células del manto). Como se muestra en la FIGURA 4A, se encontró que todas las líneas celulares positivas para CD20 probadas tenían un aumento significativo en la destrucción de células mediada por rituximab/NHS cuando las células se pre-incubaron con Ad35K++.

También se probaron células de linfoma primario de pacientes con B-LLC. Los niveles superficiales de CD20 sobre células de linfoma primario variaron más en líneas celulares establecidas (datos no mostrados). Pareció que los niveles de CD20 determinaron la sensibilidad de cultivos de linfomas primarios para destruir por rituximab/NHS. Por ejemplo, células CCL-3 que expresaron bajos niveles de CD20 fueron relativamente resistentes a la destrucción por rituximab/NHS, mientras que células CCL-p11 que expresaron mayores niveles de CD20 fueron más susceptibles a destruir por rituximab/NHS. En general, como se muestra en la FIGURA 4B, la pre-incubación de células de CCL con proteína mutante Ad35K++ aumentó significativamente la eficacia de la destrucción mediada por rituximab en células de linfoma primario y positivas para CD20 establecido. Estos resultados demostraron que el mutante Ad35K++ recombinante puede usarse para reducir los niveles de CD46 sobre membranas plasmáticas y así aumentar la susceptibilidad de células tumorales a las terapias con mAb anticancerígenos mediadas por CDC, y también reducir la susceptibilidad de células a exponerse a patógenos que requieren CD46 para la unión.

La FIGURA 4C muestra niveles de CD20 y CD46 sobre PBMC normales, células de linfoma primario de pacientes con B-LLC y células Raji. Se realizó citometría de flujo usando mAb de ratón anti-CD20 humana conjugados con PE (clon 2H7) y mAb de ratón anti-CD46 humana conjugados con FITC (clon E4.3). Se muestran muestras representativas. La figura ilustra gráficamente que la muestra de células que fue la más resistente a la destrucción por Ad35K++/rituximab (CCL-3) tuvo el menor porcentaje de células CD20+ y los menores niveles de CD20.

La FIGURA 4D ilustra gráficamente el efecto de la concentración de botón de fibra de Ad35K++ sobre la CDC mediada por rituximab. La figura muestra que el efecto sensibilizante de Ad35K++ se observó a dosis de tan solo 25 ng/ml. Las condiciones experimentales fueron como se han descrito anteriormente. Las concentraciones de Ad35K++ probadas oscilaron de 0,025 mg/ml ( $4,63 \times 10^5$  moléculas de botón de fibra trímica/célula) o 9,3 moléculas de botón de fibra trímica por molécula de CD46) a 25 mg/ml.

### **EJEMPLO 3**

Este ejemplo demuestra que el pre-tratamiento con proteína Ad35K++ mutante (Asp207Gly y Thr245Ala; SEC ID N°: 5) mejora la eficacia antitumoral de rituximab en un modelo de linfoma de ratón de xenoinjerto.

## **Materiales y métodos**

**Producción de proteína de botón de fibra recombinante:** Se produjeron proteínas de botón de fibra mutantes de Ad35 recombinantes con elevada afinidad por CD46 como se describe en los Ejemplos 1 y 2. Para los estudios *in vivo* se usaron preparaciones de proteína Ad35K recombinante (no mutante; SEC ID N°: 3) y mutante Ad35K++ (Asp207Gly y Thr245Ala; SEC ID N°: 5) con menos de 0,25 UE/ml de endotoxina.

**Células:** Se mantuvieron células Raji como se describe en el Ejemplo 2.

**Estudios en animales:** Todos los experimentos que implican animales se realizaron según las pautas institucionales expuestas por la Universidad de Washington. Los ratones se alojaron en instalaciones libres de patógenos específicos. Para establecer un modelo de linfoma de xenoinjerto, se inyectaron  $3,5 \times 10^6$  células Raji en 200  $\mu$ l de PBS en la vena de la cola de ratones CB17 SCID-beige inmunodeficientes. Después de 14 días, se inyectaron intravenosamente 50  $\mu$ g de proteína de botón de fibra mutante Ad35K-279 recombinante (unión de CD46 reducida) o mutante Ad35K++ (unión de CD46 elevada) en 200  $\mu$ l de PBS. Se inyectó rituximab (50  $\mu$ g en 200  $\mu$ l de PBS) o PBS por la vena de la cola 10 horas a partir de aquí. En el primer experimento, los ratones se sacrificaron siete horas después de la inyección de rituximab o de PBS y las células de la médula ósea se lavaron de los fémures. Para los análisis de células positivas para CD20 humanas en médula ósea por citometría de flujo,  $1 \times 10^6$  células de médula ósea se pretrataron con bloqueante de Fc (anti-CD16/CD32, BD Biosciences) durante 15 minutos y a continuación se incubaron con 20  $\mu$ l de anticuerpo anti-CD20 conjugado con FITC (clon 3H7, BD Pharmingen) durante una hora a 4 °C. En el segundo experimento, los ratones se evaluaron para la aparición de parálisis de las patas traseras como el criterio de valoración de los estudios de supervivencia de Kaplan-Meier. Para los estudios de supervivencia, se inyectaron ratones con células Raji y se trataron con proteínas de botón de fibra mutantes de Ad35K-279 recombinantes o mutantes Ad35K++, seguido de rituximab o PBS como se ha descrito anteriormente.

Para establecer un segundo modelo de xenoinjerto de linfoma,  $5 \times 10^6$  células Farage humanas (CD20+) se inyectaron intravenosamente en ratones CB17 SCID/beis. 21 días después de la inyección con células Farage, se inyectaron intravenosamente 50  $\mu$ g de proteínas de botón de fibra mutantes de Ad35K-279 recombinantes (unión de CD46 reducida) o mutantes Ad35K++ (unión de CD46 elevada) en 200  $\mu$ l de PBS. Se inyectó rituximab (50  $\mu$ g en 200  $\mu$ l de PBS) o PBS por la vena de la cola diez horas a partir de aquí y los ratones se observaron para la aparición de parálisis de las patas traseras.

## **Resultados**

### **La inyección intravenosa de Ad35K++ es bien tolerada**

Estudios previos por otros usando ratones transgénicos para hCD20 han mostrado que el tratamiento con rituximab es bien tolerado. Aquí, se inyectó proteína mutante Ad35K++ recombinante intravenosamente a una dosis de 50  $\mu$ g/ratón (2,5 mg/kg) en ratones C57B1/6 transgénicos para CD46 inmunocompetentes (línea MCP8B) (Marie, J.C., et al., Nature Immunology 3:659-666 (2002)), o ratones CB17 SCID/beis inmunodeficientes. La inyección de Ad35K++ no produjo cambios en el aspecto o comportamiento del animal (datos no mostrados). Los análisis de las cifras de células sanguíneas y enzimas del suero clave seis horas y seis días después de la inyección de Ad35K++ no mostraron anomalías (datos no mostrados). En la autopsia (día 14 después de la inyección (p.i.)), no se encontraron cambios patológicos o histológicos en ninguno de los órganos analizados (cerebro, pulmón, corazón, hígado, riñón, intestinos, médula ósea). Estos resultados demuestran que la inyección intravenosa de Ad35K++ es bien tolerada en ratones sin ningún efecto adverso observado a la dosis administrada. La ausencia de daño del complemento a las células normales después de la inyección de Ad35K++ es lo más probablemente debido a la redundancia del sistema de bloqueo del complemento.

### **El pre-tratamiento con proteína mutante Ad35K++ mejora la eficacia antitumoral de rituximab in vivo**

Para establecer un modelo de linfoma de xenoinjerto, células Raji humanas (CD20+) se inyectaron intravenosamente en ratones inmunodeficientes CB17 SCID/beis. En diferentes momentos de tiempo después de la inyección de las células Raji, los ratones se sacrificaron y se analizaron muestras de glóbulos blancos periféricos, esplenocitos y células de la médula ósea para la presencia de células Raji por citometría de flujo para CD20 humana. No se encontraron cantidades significativas de células positivas para hCD20 en esplenocitos y glóbulos blancos en todos los momentos de tiempo. Sin embargo, en médula ósea, el porcentaje de células positivas para hCD20 aumentó del 20 % en el día 10 p.i. a aproximadamente el 75 % en el día 14 p.i. En los días 15/16 después de la inyección de células de Raji, los ratones desarrollaron parálisis de las patas traseras, un síntoma que se usó como un criterio de valoración en estudios de supervivencia de Kaplan-Meier.

En un estudio llevado a cabo para evaluar Ad35K++ como terapéutico, 14 días después de la inyección de células Raji, los ratones recibieron tanto 50  $\mu$ g de proteína mutante Ad35K++ (unión de CD46 elevada) como 50  $\mu$ g de mutante Ad35K-279 (unión de CD46 reducida). Diez horas después, el tratamiento de tanto PBS como 50  $\mu$ g de rituximab se inyectó por la vena de la cola. Un grupo de ratones se sacrificó seis horas después y se midió el efecto de los diversos tratamientos sobre la destrucción de células Raji *in vivo* basándose en el porcentaje de células

positivas para hCD20 en la médula ósea, como se muestra en la FIGURA 5A. En comparación con ratones de control tratados con Ad35K-279, no se observó efecto terapéutico significativo cuando la proteína mutante Ad35K++ o rituximab se inyectaron solos. Sin embargo, como se muestra en la FIGURA 5A, la combinación de pre-tratamiento con proteína mutante Ad35K++ seguido de administración de rituximab produjo una disminución significativa en células positivas para hCD20 en la médula ósea. Estos hallazgos se confirmaron en estudios de supervivencia. Como se muestra en la FIGURA 5B, hubo un aumento significativo en la supervivencia cuando los ratones se pre-trataron con Ad35K++/rituximab en comparación con rituximab solo o tratamiento de control (rituximab en comparación con Ad35K++/rituximab:  $p=0,0050$ ; Ad35K-279 en comparación con Ad35K++/rituximab:  $p=0,0016$ ). No hubo diferencia en la supervivencia entre los grupos de control (Ad35K-279) y de Ad35K++ solo (datos no mostrados). De forma interesante, rituximab solo no ejerció un efecto terapéutico *in vivo* (Ad35K-279 frente a rituximab:  $p=0,1289$ ), que es a diferencia de lo que se observó *in vitro*. Es probable que el efecto de rituximab sea dependiente de la dosis y puede ser más fuerte a mayores dosis.

Y, lo que es más importante, la inyección previa de Ad35K++ mejoró enormemente la eficacia antitumoral de rituximab inyectado a una dosis que fue equivalente a una dosis usada en pacientes humanos (que oscila de 2 a 250 mg/kg). En un intento por aumentar adicionalmente la eficacia terapéutica de este enfoque, una segunda ronda de Ad35K++/rituximab se inició 72 horas después de la primera inyección de rituximab (FIGURA 5B). Al igual que en la primera ronda de terapia, la proteína de botón de fibra mutante Ad35K++ se inyectó intravenosamente en los ratones, seguido diez horas a partir de aquí por inyección de rituximab por la vena de la cola. Como se muestra en la FIGURA 5B, la inyección repetida de proteína mutante Ad35K++ y rituximab aumentó la supervivencia media a 24 días, en comparación con 16,5 días con el tratamiento con rituximab solo.

Para establecer un segundo modelo de xenoinjerto de linfoma,  $5 \times 10^6$  células Farage humanas (CD20+) se inyectaron intravenosamente en ratones inmunodeficientes CB17 SCID/beis. La aparición de morbilidad se observó 23 días después de la inyección con lesiones tumorales detectadas en el bazo e hígado. Para evaluar la eficacia de Ad35K++ como terapéutico en este modelo, 21 días después de la inyección de células Farage, los ratones recibieron tanto 50  $\mu$ g de proteína mutante Ad35K++ (unión de CD46 elevada) como 50  $\mu$ g de mutante Ad35K-279 (unión de CD46 suprimida). Diez horas después, el tratamiento de tanto PBS como 50  $\mu$ g de rituximab se inyectó por la vena de la cola. Como se muestra en la FIGURA 5C y 5D, hubo un aumento significativo en la supervivencia cuando los ratones se pre-trataron con Ad35K++ antes del tratamiento con rituximab en comparación con rituximab solo o tratamiento de control ( $p<0,001$ ). No hubo diferencia en la supervivencia entre los grupos de control (Ad35K-279) y de Ad35K++ solo (FIGURA 5D). Al igual que en el contexto del modelo de xenoinjerto de células Raji, el tratamiento de rituximab solo no ejerció un efecto terapéutico *in vivo* ( $p=0,145$ ).

La FIGURA 5E ilustra gráficamente el porcentaje de células positivas para CD20 humanas en médula ósea, ganglios linfáticos mesentéricos o bazo en ratones tratados sacrificados 12 horas después de la administración de tanto PBS como rituximab, como se mide por citometría de flujo. La combinación de Ad35K++ y rituximab produjo una disminución significativa en células positivas para CD20 humanas en la médula ósea, ganglios linfáticos y bazo ( $P<0,03$ ),  $n=7$ .

En resumen, los resultados de este ejemplo demuestran que el pre-tratamiento con proteína mutante Ad35K++ seguido de rituximab aumenta la destrucción de células tumorales en comparación con tratamientos con rituximab solo.

El hecho de que Ad35K++ aumentara drásticamente la eficacia antitumoral en ratones inmunodeficientes indica que las células inmunitarias no participan en la destrucción tumoral mediada por rituximab/complemento. Este resultado demuestra que el tratamiento con Ad35K++/rituximab es eficaz en ratones inmunosuprimidos, que es predictivo de la eficacia de un efecto antitumoral en pacientes inmunosuprimidos, que evita la posible cuestión con respecto al desarrollo de anticuerpos neutralizantes contra la proteína Ad35K++ viral, permitiendo ciclos de tratamiento repetidos. Adicionalmente a este respecto, se ha mostrado en modelos animales que la inyección repetida de vectores de adenovirus oncolíticos tras la inmunosupresión es eficaz y aumenta la eficacia antitumoral de la viroterapia (Thomas, M.A., et al., Mol. Ther. 16:1665-1673 (2008)).

Se generarán respuestas a dosis en el modelo de linfoma de xenoinjerto de células Raji usando ratones CB17 SCID-beis. El efecto terapéutico de la administración de mutante Ad35K++/rituximab se analizará adicionalmente cuantificando células de linfoma humano en la sangre periférica y ganglios linfáticos de ratones CB17 SCID-beis de xenoinjerto.

Se apreciará por aquellos expertos en la materia que los métodos descritos en el presente documento para administrar Ad35K++ para sensibilizar células a CDC no se limitan a los tratamientos con CD20/rituximab, y pueden aplicarse para sensibilizar células a CDC en el contexto de otros mAb anticancerígenos. Por ejemplo, puede usarse Ad35K++ para sensibilizar células tumorales que expresan CD52 a alemtuzumab (Campath), un mAb anti-CD52, para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica. En otro ejemplo, puede usarse Ad35K para sensibilizar células tumorales que expresan CD33 a Gemtuzumab, un mAb anti-CD33, para el tratamiento de leucemia mielocítica aguda.

**EJEMPLO 4**

Este ejemplo describe el análisis de la inmunogenicidad de la proteína de botón de fibra de Ad35 no mutante recombinante (SEC ID N°: 3) y Ad35K++ mutante (Asp207Gly y Thr245Ala; SEC ID N°: 5) en pacientes con cáncer humanos.

**Materiales y métodos**

Se analizó el suero de 20 pacientes humanos con cáncer para la presencia de anticuerpos que reaccionaron con tanto proteína recombinante Ad35K (no mutante) como proteína mutante Ad35K++ recombinante (Asp207Gly y Thr245A1a).

**Estudio humano**

Se probó el suero de 20 pacientes con cáncer para la presencia de anticuerpos que reaccionaron con tanto proteína Ad35K recombinante (no mutante) como proteína mutante Ad35K++ recombinante del siguiente modo. Se separaron hexona de Ad5 recombinante (no desnaturalizada), botón de fibra de Ad5, Ad35K y Ad35K++, además de viriones de Ad5 desnaturalizados, por electroforesis PAG y las proteínas transferidas se incubaron con suero humano. Entonces se detectó la presencia de anticuerpos específicos para Ad en suero por anti-IgG humana-HRP.

**Resultados**

La Tabla 3 resume los resultados del análisis de transferencia Western del experimento llevado a cabo para medir la presencia de anticuerpos específicos para Ad en suero humano.

**Tabla 3: Inmuno-reactividad de botones de fibra de Ad35 con suero de pacientes con cáncer.**

	Ad5 virus	Ad5 hexón	Ad5K	Ad35K	Ad35K++
Mancha Coomassie	++	++	+++	+++	+++
Western (suero de pacientes humanos con cáncer)	++	++	+	-	-

Como se muestra anteriormente en la Tabla 3, no se detectaron anticuerpos que reaccionaran con tanto Ad35K como Ad35K++ en el suero de los 20 pacientes con cáncer probados. Por otra parte, la mayoría de las muestras de suero humano probadas contuvieron anticuerpos específicos para hexona de Ad5, botón de fibra de Ad5 y pentona de Ad5. Este resultado no fue sorprendente. Aunque la gran mayoría de los seres humanos tienen anticuerpos neutralizantes contra Ad5 (Sumida, S.M., et al., Journal of Immunology 174:7179-7185 (2005)), menos del 10 % de los seres humanos tienen anticuerpos neutralizantes contra Ad35 (Nwanegbo, E., et al., Clin. Diagn. Lab. Immunol. 11:351-357 (2004); Abbink, P., et al., Journal of Virology 81:4654-4663 (2007); Reddy, P.S., et al., Virology 311:384-393 (2003)).

**EJEMPLO 5**

Este ejemplo describe el análisis de la inmunogenicidad de la proteína de botón de fibra de Ad35 no mutante (SEC ID N°: 3) y Ad35K++ mutante recombinante (Asp207Gly y Thr245Ala; SEC ID N°: 5) en ratones inmunocompetentes por inyecciones repetidas de la proteína recombinante y análisis de la presencia de anticuerpos anti-Ad35K++ después de la inyección.

**Estudios de ratón:**

Para los estudios de inmunización con proteínas de botón de fibra de Ad35 recombinantes, cinco ratones C57B1/6 transgénicos para CD46 inmunocompetentes (línea MCP8B) (Marie, J.C., et al., Nature Immunology 3:659-666 (2002)) recibieron tanto una única inyección intravenosa de 50 µg de proteína Ad35K++ recombinante o proteína Ad35K en el día 0 (pauta terapéutica) como un total de tres inyecciones subcutáneas de 5 µg de proteína Ad35K++ recombinante o proteína Ad35K en el día 0, 3 y 6 (pauta de vacunación). Se recogió suero de los ratones cuatro semanas después y se analizó para los anticuerpos específicos para Ad por transferencia Western, como se describe en el Ejemplo 2. Todos los experimentos que implican animales se realizaron según las pautas institucionales expuestas por la Universidad de Washington.

**Resultados**

La Tabla 4 resume los resultados del análisis de transferencia Western del experimento llevado a cabo para medir la presencia de anticuerpos específicos para Ad35K o Ad35K++ en suero de ratón después de una única inyección intravenosa o después de una serie de tres inyecciones subcutáneas de Ad35K o Ad35K++.

**Tabla 4: Inmuno-reactividad de proteínas de botón de fibra de Ad35 después de infección en ratones**

	Ad35K	Ad35K++	Ad35 virus
Mancha Coomassie	++	++	+
Western (suero después de régimen de vacunación: serie de tres inyecciones subcutáneas)	+	++	-
Western (suero después de régimen terapéutico: administración única IV)	-	-	-

Como se muestra anteriormente en la Tabla 4, se detectaron anticuerpos en suero que reaccionaban con Ad35K++ y, a un menor grado, con Ad35K en ratones que recibieron tres inyecciones subcutáneas de las proteínas recombinantes; sin embargo, no se observaron anticuerpos detectables cuando proteínas Ad35K++ recombinantes o Ad35K se inyectaron intravenosamente. Esto es probablemente debido a la ineficaz captación de las proteínas recombinantes (Ad35K++ o Ad35K) por células presentadoras de antígeno después de la inyección intravenosa.

La Tabla 5 muestra los parámetros hematológicos después de la inyección de Ad35K++. Ratones transgénicos para CD46 macho y hembra (cepa MCP8B) se inyectaron intravenosamente con 50 mg de Ad35K++ y se analizaron muestras de sangre 16 y 48 horas después. Se muestra el promedio de dos mediciones en comparación con animales tratados de control. En ratones, el homólogo de CD46 se expresa solo en el testículo. Así, los ratones transgénicos que expresan huCD46 en un patrón y a niveles similares a seres humanos pueden ser un mejor modelo para estudios de seguridad. La misma dosis de Ad35K++ que se usó en los estudios de terapia se inyectó intravenosamente en ratones C57B1/6 inmunocompetentes transgénicos para huCD46 (cepa MCP-8B). Los análisis de las cifras de células sanguíneas y otros parámetros hematológicos 6 y 48 horas después de la inyección de Ad35K++ no mostraron anomalías (TABLA 5). En la autopsia (día 14 p.i.), no se encontraron cambios patológicos o histológicos en todos los órganos analizados (cerebro, pulmón, corazón, hígado, riñón, intestinos, médula ósea).

**Tabla 5: Parámetros hematológicos después de la inyección de Ad35K++**

	Simulado		Ad35K++ (16h p.i.)		Ad35K++ (48h p.i.)	
	Masculino	Femenino	Masculino	Femenino	Masculino	Femenino
Glóbulos Blancos de Sangre (K/ml)	11.98	10.62	10.61	12.7	11.92	10.76
Neutrófilos (%)	19.91	23.15	22.56	30.1	22.27	22.21
Linfocitos (%)	75.93	69.88	68.46	62.28	68.69	72.12
Monocitos (%)	6.18	6.49	7.46	6.14	6.44	5.33
Eosinófilos (%)	0.92	0.39	1.3	1.2	2.17	0.25
Basófilos (%)	0.06	0.09	0.23	0.28	0.43	0.1
Glóbulos Rojas de Sangre (M/ml)	9.52	9.31	9.28	8.81	9.23	9.52
Plaquetas (K / ml)	721	781	605	586	539	843
Hemoglobina (g/dL)	16.2	16	15.1	14.7	15.3	15.2
Sodio (mEq/L)	156	152	152	154	152	154
Potasio (mEq/L)	8.2	6.8	7.2	7.6	8.2	8.2
Cloruro (mEq/L)	120	120	118	120	116	120
Dióxido de carbono (mEq/L)	18	20	18	22	20	16
Ion Gap	18	12	16	12	16	18
Glucosa (mg/dL)	110	168	128	158	142	120
Urea Nitrogeno (mg/dL)	18	18	20	18	14	16
Creatinina (mg/dL)	0.2	<0.1	<0.1	<0.1	0.2	0.2
Proteína (Total) (g/dL)	5	4.8	5	5	4.8	4.6

5	Albúmina (g/dL)	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
	Bilirrubina (Total)(mg/dL)	<0.1	0.2	0.4	0.6	0.4
	Calcio (mg/dL)	10.8	10.8	10.8	10.8	10.6
	GOT (U/L)	356	182	178	222	242
10	Alq. fosfatasa (U/L)	172	196	160	198	148
	GPT (U/L)	74	52	52	58	50
						48

15 Adicionalmente, con el fin de determinar el efecto de la presencia de anticuerpos anti-Ad35K++ sobre la destrucción de células en el ensayo descrito en el Ejemplo 2, el suero de ratones vacunados o sin tratamiento previo se usó junto con Ad35K++ en ensayos de CDC mediada por rituximab. Como se muestra en la FIGURA 6, independientemente de la presencia de anticuerpos anti-Ad35K++, se observó el mismo efecto estimulante de Ad35K++ en sensibilizar células a la destrucción de células mediada por CDC. Aunque no se desea quedar ligado a teoría particular alguna, se cree que esto puede ser debido al hecho de que la interacción de Ad35K++ con CD46 es de muy alta afinidad y no puede romperse por anticuerpos anti-Ad35K++ policlonales que se desarrollaron en los ratones inyectados subcutáneamente con Ad35K++.

### **EJEMPLO 6**

25 Este ejemplo describe métodos para reducir la inmunogenicidad de la proteína de botón de fibra de Ad35K modificada para garantizar la seguridad y eficacia de administraciones repetidas en un sujeto mamífero.

#### ***Base teórica***

30 Como se observa anteriormente en el Ejemplo 5, se observó una diferencia entre los niveles de anticuerpos que se indujeron con Ad35K++ frente a Ad35K, como se muestra en la Tabla 4. Aunque no se desea quedar ligado a teoría particular alguna, se cree que pequeños cambios dentro de la proteína de botón de fibra Ad35K conducen a pérdida o disminución de la inmunogenicidad. Se ha informado previamente que los epítopes dentro del botón de fibra de Ad5 son conformacionales (Gahery-Segard, H., et al., Journal of Virology 72:2388-2397 (1998)). También se ha sugerido que los cambios conformacionales producidos por las variaciones de bucles superficiales expuestos en el botón de fibra de Ad podrían ser una forma eficaz para que el virus escapara de la neutralización por anticuerpo (Pache, L., et al., Journal of Virology 82:7923-7931 (2008)). Por tanto, la inmunogenicidad de las proteínas mutantes de Ad35 recombinantes puede reducirse usando métodos rutinarios conocidos en la técnica, como se describe en detalle a continuación.

40

#### ***Modelado de epítopes***

45 Se modela el perfil de antigenicidad/hidrofilia de Ad35K++ usando el paquete de software MacVector 6.5.3, basado en los algoritmos de Kyte-Doopoco y Hopp-Wood (Kyte y Doopoco, 1982; Hopp y Woods, 1981). Las regiones de unión de la clase I y II del MHC se ha predicho usando ProPred-I y -II (Singh, H., y Raghava, G.P.S., "ProPred1: Prediction of Promiscuous MHC Class-I Binding Sites", Bioinformatics 19:1009-1014 (2003); Singh, H., and Raghava, G.P.S., "ProPred: Prediction of HLA-DR Binding Sites", Bioinformatics 17:1236-37 (2001)).

50 Se introducen mutaciones correspondientes en la proteína usando un kit de PRC de mutagénesis dirigida al sitio comercialmente disponible como se describe en cualquier parte (Wang et al., Journal of Virology 82:10567-10579 (2008)).

#### ***Generación de bajos mutantes inmunogénicos***

55 Se introducen mutaciones aleatorias en el ácido nucleico que codifica AD35K++ (SEC ID N°: 3, codificada por SEC ID N°: 4) creando una biblioteca de mutantes aleatoria como se describe en el Ejemplo 1. Las transferencias resultantes se seleccionan para la preservación de sitios de unión de CD46 y baja reactividad con anticuerpos anti-Ad35K++. Específicamente, se incubaron las transferencias con suero de sujetos que se sabe que tienen anticuerpos neutralizantes para Ad35K. La unión de anticuerpos neutralizantes se visualiza con HRP anti-Fc humano. Se seleccionan las colonias no unidas a anticuerpos neutralizantes. A continuación se analizan proteínas de botón de fibra purificadas de colonias seleccionadas para la capacidad para unirse a CD46. Las proteínas mutantes recombinantes de Ad35K identificadas en el ensayo se administran entonces a células de linfoma conjuntamente con rituximab como se describe en los Ejemplos 2 y 3, y se evaluará la eficacia de los mutantes en presencia de suero de paciente. La reducida inmunogenicidad de los mutantes Ad35K recombinantes seleccionados se confirma por inyecciones subcutáneas repetidas de las proteínas mutantes en ratones inmunocompetentes como se describe en el Ejemplo 5.

65

**EJEMPLO 7**

5 Este ejemplo describe métodos para potenciar el potencial terapéutico de Ad35K mutante recombinante por modificación para incluir cadenas de polietilenglicol.

**Métodos**

10 Se añaden cadenas de polietilenglicol a proteínas Ad35K modificadas recombinantes, tales como Ad35K++, mezclando 100 µg de proteína recombinante purificada con 10 mg/ml de tanto propionato de metoxipolietilenglicol-succinimidilo (mPEG SPA, MW 5000; Nektar Therapeutics, Huntsville, AL) como Sunbright ME-050HC (MW 5000; NOF, Tokio, Japón) en tampón fosfato de potasio 0,1 mM (K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, 5 % [peso/volumen] de sacarosa; pH 7,8). Después de la incubación durante una hora a temperatura ambiente, la reacción se inactiva con lisina. El exceso de lisina y las moléculas de PEG no reactivas se eliminan por cromatografía de filtración en gel (Sephadex G50; GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ). Las Ad35K++ PEGiladas resultantes se evalúan para la unión de CD46 y la capacidad de potenciar CDC inducida por rituximab, como se describe en el Ejemplo 2. Además, la eficacia *in vivo* de la terapia que implica Ad35K++ PEGilada / rituximab se evalúa por estudios de supervivencia y cuantificando las células de linfoma humano en la sangre periférica y ganglios linfáticos de ratones CB17 SCID-beis de xenoinjerto, como se describe en el Ejemplo 3.

**EJEMPLO 8**

Este ejemplo describe el efecto de Ad35K++ sobre células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

25 **A. El efecto de la pre-incubación de Ad35K++ sobre PBMC humanas normales, células positivas para CD20 clasificadas de PBMC humanas normales y reservas de cultivos de células humanas primarias.**

**Métodos**

30 Se clasificaron PBMC humanas reunidas de tres donantes sanos para células positivas para CD20 usando FACS. Las células positivas para CD20 se cultivaron durante tres días. Se trataron un total de  $1 \times 10^5$  células positivas para CD20, o PBMC (sin clasificar, cultivadas durante tres días) con Ad35K++ (25 µg/ml), seguido de rituximab (15 µg/ml) y NHS (25 % de concentración final) ocho horas después. Cuatro horas después de añadir NHS, las células viables se contaron basándose en exclusión con azul de tripano. La viabilidad celular de células tratadas con PBS se consideró el 100 %.

40 También se llevaron a cabo estudios *in vitro* sobre una serie de cultivos de células humanas primarias, que incluyen células endoteliales vasculares, células epiteliales de la córnea, células epiteliales de la superficie del ovario y fibroblastos de prepucio. Se trataron un total de  $1 \times 10^5$  células con Ad35K++ (25 µg/ml), seguido de rituximab (15 µg/ml) y NHS (20 % de concentración final) ocho horas después. Cuatro horas después de añadir NHS, las células se lavaron y se midió la viabilidad por el ensayo de proliferación de células WST-1 (comercialmente disponible de Roche, Cat nº 11 644 807 001) 30 minutos después de añadir el reactivo de tinción. La viabilidad celular de células tratadas con PBS se consideró el 100 %.

**Resultados**

50 La FIGURA 7A ilustra gráficamente el porcentaje de células positivas para CD20 viables cultivadas de PBMC humanas después de la incubación con solución salina tamponada con fosfato (PBS), rituximab solo, suero humano normal (NHS), pretratamiento con Ad35K++ más NHS, rituximab más NHS, o pretratamiento con Ad35K++ más rituximab más NHS. Como se muestra en la FIGURA 7A, rituximab destruyó el 15 % de las células, y la adición de NHS a rituximab aumentó el porcentaje de células CD20+ muertas al 35 % cuando se comparó con controles tratados con PBS ( $p < 0,05$ ). Como se muestra adicionalmente en la FIGURA 7A, la pre-incubación con Ad35K++ produjo destrucción mediada por rituximab/NHS de aproximadamente el 75 % de las células CD20+ humanas primarias. Como se muestra adicionalmente en la FIGURA 7A, no hubo cambio en la viabilidad celular para las células incubadas con NHS solo. El pretratamiento con Ad35K++ solo no destruyó PBMC positivas para CD20 (datos no mostrados). Como se muestra en la FIGURA 7A, la combinación de pretratamiento con Ad35K++ y NHS produjo una disminución no significativa en la viabilidad celular ( $p = 0,12$ ).

60 La FIGURA 7B ilustra gráficamente el porcentaje de PBMC humanas viables cultivadas con solución salina tamponada con fosfato (PBS), rituximab solo, suero humano normal (NHS), pretratamiento con Ad35K++ más NHS, rituximab más NHS, o pretratamiento con Ad35K++ más rituximab más NHS. Como se muestra en la FIGURA 7B, no se observó disminución significativa en la viabilidad celular después de la incubación con rituximab/NHS y Ad35K++/rituximab/NHS.

65 Como se muestra en la FIGURA 7C, no hubo diferencia significativa en la viabilidad celular para células endoteliales vasculares, células epiteliales de la córnea, células epiteliales de ovario o células de fibroblastos de prepucio

incubadas con Ad35K++, rituximab o NHS solo en comparación con células de control tratadas con PBS (N=5). En particular, Ad35K++/NHS y Ad35K++/rituximab/NHS produjeron una disminución insignificante de la viabilidad celular, probablemente debido al hecho de que estos tipos de células no expresan CD20. Se obtuvieron datos similares después de la incubación de líneas celulares transformadas con CD20 negativas tales como células HeLa (cáncer de cuello uterino), Mo7e (eritroleucemia), BT474 (cáncer de mama), SK-BR-3 (cáncer de mama), A549 (cáncer de pulmón) y HT-29 (cáncer de colon) con rituximab, Ad35K++/NHS o Ad35K/rituximab/NHS (datos no mostrados).

En resumen, los estudios *in vitro* muestran que la pre-incubación con Ad35K++ de PBMC positivas para CD20 primarias, células B-LLC primarias y líneas celulares de linfoma aumentan la citotoxicidad de rituximab (mAb anti-CD20). A diferencia, no se observó destrucción significativa mediada por el complemento mediada por Ad35K++ de células negativas para CD20 primarias.

### **B. Niveles de CD20 y CD46 de PBMC normales, células de linfoma primario de pacientes con B-LLC y células Raji.**

Se determinaron niveles de CD20 y CD46 de PBMC normales, células de linfoma primario de pacientes con B-LLC y células Raji usando citometría de flujo. La citometría de flujo se realizó usando mAb de ratón anti-CD20 humana conjugados con PE (clon 2H7, BD Pharmingen Franklin Lakes, NJ) y mAb de ratón anti-CD46 humano conjugados con FITC (clon E4.3, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 6.

**TABLA 6: Resultados del análisis de citometría de flujo**

Tipo de célula	% CD20 + Positivo (intensidad media de fluorescencia)	% CD46+ Positivo (intensidad media de fluorescencia)
PBMC	9.1%	98.1%
CLL-3	49.3%	80%
CLL-4	53.1%	71.5%
CLL-pII	85%	85.6%
Raji	99.8%	99.5%

Como se muestra anteriormente en la Tabla 6, los estudios de citometría de flujo mostraron niveles de CD46 altos y relativamente uniformes sobre células de leucemia linfocítica crónica (B-LLC) primarias y células de linfoma de prueba. Como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2, la pre-incubación de células de B-LLC con Ad35K++ aumentó significativamente la eficacia del tratamiento de rituximab/NHS. Es notable que la muestra de células que fue la más resistente a la destrucción por Ad35K++/rituximab fuera CLL-3 (véase la FIGURA 4B), que también tuvo el menor porcentaje de células positivas para CD20 y los menores niveles de CD20 en comparación con otras células primarias de otros pacientes con B-LLC.

### **C. Eliminación mediada por Ad35K++ de CD46 de la superficie de PBMC humanas normales.**

Métodos: PBMC humanas reunidas de tres donantes sanos, como se ha descrito anteriormente, se incubaron con tanto solución salina tamponada con fosfato (PBS) como Ad35K++ (10 ug/ml) durante 12 horas. Entonces se analizó la expresión de CD46 por FACS usando anticuerpos anti-CD46 marcados con PE.

Resultados: Se determinó que los valores de la intensidad media de fluorescencia para PBMC incubadas en PBS eran 563 (+/-23). Los valores de la intensidad media de fluorescencia para PBMC incubadas en Ad35K++ se redujeron significativamente a 286 (+/- 16). Por tanto, estos resultados demuestran que la incubación de PBMC con Ad35K++ produce una disminución en los niveles de CD46 superficial.

Discusión: Como se ha descrito anteriormente, CD20 se expresa sobre linfocitos B humanos maduros. Este ejemplo muestra que rituximab/NHS destruye PBMC positivas para CD20 primarias, y esta citólisis se potencia por la pre-incubación de las células con Ad35K++. Es importante considerar este efecto secundario en la práctica clínica. Por otra parte, el efecto de la potenciación de Ad35K++ sobre la destrucción con rituximab de linfocitos B primarios tiene implicaciones prácticas, ya que rituximab se usa actualmente en pacientes para tratar enfermedades autoinmunitarias (Owczarczyk, K., et al. *Ann Rheum Dis.* 67:1648-1649 (2008); Petereit, H., et al. *Mult. Scler.* 15:189-192 (2009)), y también se usa en pacientes para tratar rechazo agudo mediado por anticuerpos de trasplantes (Yang, Y.W., et al., *Exp Clin Transplant* 6:211-214 (2008)).

Sin embargo, estudios en PBMC y células humanas primarias negativas para CD20 demostraron que la incubación con Ad35K++/NHS causó solo toxicidad mínima, aún cuando se mostró que el tratamiento con Ad35K++ de PBMC desencadenó la eliminación de CD46 de la superficie celular. En particular, PBMC humanas, a diferencia de células

Raji, expresan altos niveles de otras dos proteínas reguladoras del complemento de la membrana, CD55 y CD59, que pueden protegerlas de CDC. Además, la densidad de CD46 sobre células primarias es al menos un orden de magnitud menor que en células de linfoma, como se muestra anteriormente en la Tabla 6. Como se ha descrito adicionalmente en este ejemplo, posterior a la incubación con Ad35K++, la intensidad media de fluorescencia de CD46 disminuyó solo 1,97 (+/- 0,21) veces en PBMC, mientras que disminuyó 7,54 (+/-0,35) veces en células Raji. También es digno de atención que los ensayos *in vitro* descritos en este ejemplo usaron una concentración de Ad35K++ (25 ug/ml =  $5 \times 10^8$  moléculas de botón de fibra de Ad35K++ por célula), una cantidad que es poco probable que se logre después de la inyección de Ad35K++ intravenosa *in vivo*. [Obsérvese que 0,025 ug/ml de Ad35K++ es igual a  $4,63 \times 10^5$  moléculas de botón de fibra trómera /célula o 9,3 moléculas de botón de fibra trómera por molécula de CD46].

## **EJEMPLO 9**

Este ejemplo demuestra que el tratamiento con Ad35K++ mejora la eficacia antitumoral de rituximab *in vivo* en un modelo de linfoma de xenoinjerto.

### **Métodos:**

#### **1. Esquema experimental nº 1:**

Para establecer un modelo de linfoma de xenoinjerto,  $3 \times 10^6$  células Raji de linfoma humano (positivas para CD20) se inyectaron en ratones CB17-SCID/beis inmunodeficientes por inyección en la vena de la cola. Catorce días después, cuando los ratones de control desarrollaron los primeros síntomas clínicos, los animales se inyectaron intravenosamente con 50 ug (2,5 mg/kg) de Ad35K-279 (control negativo de mutante) o 50 ug (2,5 mg/kg) de Ad35K++. Se administró rituximab (50 ug) o PBS intravenosamente 10 horas después por la vena de la cola. En el Esquema experimental nº 1, los ratones se sacrificaron 12 horas después y los tejidos se analizaron para células positivas para CD20 humanas para determinar el efecto de Ad35K-279, Ad35K++, rituximab y Ad35K++/rituximab sobre la destrucción de células Raji *in vivo* basándose en el porcentaje de células positivas para CD20 humanas en la médula ósea y ganglios linfáticos.

#### **Medición de Raji (células positivas para CD20):**

14 días después de la inyección intravenosa de células Raji, los ratones se sacrificaron, se recogieron los fémures, bazo y ganglios linfáticos mesentéricos y los glóbulos blancos periféricos, esplenocitos, células de ganglios linfáticos mesentéricos y células de la médula ósea se analizaron para la presencia de células Raji por citometría de flujo para CD20 humana e inmunomicroscopía de fluorescencia. Se analizaron los ganglios linfáticos y secciones del bazo por inmunomicroscopía de fluorescencia con anticuerpos anti-CD20 marcados con FITC. Para las secciones de hueso se usó el kit de detección "Klear Mouse DAB" (Golden Bridge International Inc., Mukilteo WA). La especificidad de tinción se confirmó por tinción con anticuerpos del mismo isotipo correspondientes (control negativo) y anticuerpos específicos para un marcador mitocondrial humano (control positivo).

### **Resultados**

14 días después de la inyección intravenosa de células Raji, se determinó que las células Raji positivas para CD20 humanas se encontraron predominantemente en la médula ósea y ganglios linfáticos y fueron muy escasas en el bazo (datos no mostrados). El porcentaje de células positivas para CD20 humanas aumentó del 20(+/-4) % (médula ósea) y 5(+/-1,2) % (ganglios linfáticos) en el día 10 después de la inyección de células Raji al 75(+/-6) % y 42(+/-4) %, respectivamente, en el día 14 después de la inyección. En el día 15 ó 16 después de la inyección de células Raji, los ratones desarrollaron parálisis de las patas traseras, un síntoma que se usó después como criterio de valoración en estudios de supervivencia de Kaplan-Meier.

La FIGURA 8A ilustra gráficamente el porcentaje de células positivas para CD20 humanas en médula ósea o ganglios linfáticos mesentéricos en ratones tratados sacrificados 12 horas después de la administración de tanto PBS como rituximab, como se mide por citometría de flujo (N=5). Como se muestra en la FIGURA 8A, en comparación con ratones de control tratados con Ad35K-279, no se observó disminución significativa en los números de células positivas para CD20 humanas cuando Ad35K++ o rituximab se inyectaron solos. A diferencia, la combinación de Ad35K++ y rituximab produjo una disminución significativa en células positivas para CD20 humanas en tanto la médula ósea como los ganglios linfáticos ( $p < 0,03$ ).

La FIGURA 8B ilustra una supervivencia de Kaplan-Meier de los ratones tratados según el Esquema experimental nº 1 (N=10). Según los hallazgos demostrados en la FIGURA 8A, hubo un aumento sorprendente en la supervivencia cuando los ratones se trataron con Ad35K++/rituximab en comparación con rituximab solo o control de Ad35K-279. Las diferencias en la supervivencia fueron significativas (rituximab en comparación con Ad35K++/rituximab:  $p=0,0050$ ); (Ad35K-279 en comparación con Ad35K++/rituximab:  $p=0,0016$ ). No hubo diferencia significativa en la supervivencia entre los controles (PBS o Ad35K-279) y grupos de Ad35K++ solo.

Se observa que rituximab a una dosis de 2,5 mg/kg solo no ejerció un efecto terapéutico significativo *in vivo* (Ad35K-279 en comparación con rituximab :  $p=0,1289$ ). Se llevó a cabo un estudio de dosis-respuesta de rituximab del siguiente modo. Se inyectaron ratones con células Raji como se describe para el Esquema experimental nº 1. Dos semanas después, se administraron intravenosamente PBS o dosis diferentes de rituximab (50 ug, 100 ug y 250 ug por ratón, en un volumen total de 200 ul). Se monitorizó la supervivencia (aparición de parálisis de las patas traseras) (N=7). Se determinó que un aumento de rituximab a una dosis de 12,5 mg/kg produjo eficacia terapéutica (datos no mostrados).

## 2. Esquema experimental nº 2:

Se probó un segundo esquema experimental y se encontró que permitió la supervivencia a largo plazo de ratones trasplantados con células Raji de linfoma. El segundo esquema experimental se llevó a cabo del siguiente modo:

Para establecer un modelo de linfoma de xenoinjerto,  $3 \times 10^6$  células Raji de linfoma humano (positivas para CD20) se inyectaron en ratones CB17-SCID/beis inmunodeficientes por inyección de la vena de la cola. Trece días después, el primer ciclo de tratamiento empezó con dos inyecciones intravenosas de 50  $\mu$ g (2,5 mg/kg) de Ad35K++ separadas 6 horas. Seis horas después de la segunda inyección de Ad35K++, los ratones recibieron una inyección intravenosa de rituximab (50  $\mu$ g). Se empezó un segundo ciclo de tratamiento 36 horas después, que fue el mismo que el primer ciclo de tratamiento (es decir, dos inyecciones intravenosas de 50  $\mu$ g (2,5 mg/kg) de Ad35K++ separadas 6 horas. Seis horas después de la segunda inyección de Ad35K++, los ratones recibieron una inyección intravenosa de rituximab (50  $\mu$ g). La aparición de parálisis de las patas traseras sirvió de criterio de valoración en estudios de supervivencia.

## Resultados

La FIGURA 8C es un estudio de supervivencia de Kaplan-Meier de los ratones tratados según el Esquema de tratamiento nº 2, que muestra la supervivencia (medida por la aparición de parálisis de las patas traseras) en ratones que recibieron tanto un ciclo de tratamiento (1x: rituximab más Ad35K++) como ratones que recibieron dos ciclos de tratamiento (2x: rituximab más Ad35K++), o los tratamientos de control: 1x rituximab, 2x rituximab, 2x Ad35K++ o PBS. Como se demuestra en la FIGURA 8C, el Esquema de tratamiento nº 2, que implicó dos ciclos de inyección doble de Ad35K++ seguido de aplicación de rituximab, permitió la supervivencia a largo plazo de ratones trasplantados con células Raji de linfoma. Es notable que el tratamiento empezó en un estadio muy avanzado (es decir, 3 días) antes de que los ratones de control murieran. Como se muestra en la FIGURA 8C, el sesenta por ciento de los ratones portadores de linfoma de Raji con pautas de tratamiento de 2x (rituximab más Ad35K++) sobrevivieron más de los 44 días (el tiempo de seguimiento). A diferencia, todos los ratones de control tratados con PBS murieron en el plazo de 16 días después del trasplante de células Raji.

La FIGURA 8D es una comparación de dominios de botón de Ad35K no mutante y de Ad35K++ en el potenciamiento de la terapia con rituximab, un estudio de supervivencia de Kaplan-Meier. En el día 14 después de la implantación de células Raji, los ratones recibieron una inyección intravenosa de 50 mg de Ad35K o Ad35K++. Diez horas después se inyectaron 50 mg de rituximab y se monitorizó la aparición de parálisis de las patas traseras (N=5,  $p=0,0079$ ). La figura muestra que en comparación con la proteína Ad35K no mutante, Ad35K++ ejerció un efecto de potenciamiento significativamente más fuerte sobre la terapia con rituximab.

## Discusión

Los resultados descritos en este ejemplo demuestran que rituximab más Ad35K++ lograron efectos antitumorales y supervivencia de los animales superiores en comparación con animales tratados con rituximab solo. La eficacia terapéutica del tratamiento con Ad35K++/rituximab en ratones inmunodeficientes indica que los linfocitos T y B no participan en la destrucción de células tumorales. Esto sugiere que el enfoque de Ad35K++/rituximab también será eficaz en pacientes inmunosuprimidos (es decir, pacientes que reciben quimioterapia). En particular, la combinación de rituximab con quimioterapia mielorreductora se usa frecuentemente clínicamente y se ha mostrado que prolonga la supervivencia libre de progresión en pacientes con linfoma no Hodgkin (LNH) (Wang, M., et al., *Cancer* 113:2734-2741 (2008)). Sin embargo, la quimioterapia también está asociada a leucopenia y tendencia a infecciones y, por tanto, son deseables enfoques para aumentar la eficacia de rituximab sin la necesidad de inmunosupresión.

Estudios preclínicos mostraron que el efecto anti-linfoma de la actividad de rituximab se suprimió completamente en ratones C57B1/6 que carecían de C1q, demostrándose así la función de activación del complemento en terapia con rituximab en ratones (DiGaetano, N., et al., *J Immunol* 171:1581-1587 (2003)). Está bien establecido que la CDC desempeña una parte en mediar en la eficacia de rituximab mediante su capacidad para potenciar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), quimiotaxia de células efectoras inmunitarias y activación de respuestas antitumorales de linfocitos T (Wang, S.Y., et al., *Expert Opin Biol Ther* 8:759-768 (2008)). Adicionalmente a este respecto, se observa que actualmente están siendo desarrollados mAb con elevada capacidad para activar CDC (véase Idusogie, E.E., et al., *J Immunol* 166:2511-2515 (2001)), tal como ofatumumab, otro mAb específico para CD20 (Arzerra) (Maloney, D.G., et al., *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007:226-232). Además, se ha informado una función de CDC en la destrucción de células tumorales para

5 alemtuzumab (un mAb anti-CD52), que se usa para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica (Zent, C.S., et al., Leuc Res 2008); para gemtuzumab (un mAb anti-CD33) que se usa para el tratamiento de LMA (Castillo, J., et al., Exp Hematol 36:755-768 (2008); además de para panitumumab y cetuximab (mAb anti-EGFR), usados para el tratamiento de cáncer de colon (Dechant, M., et al., Cancer Res 68:4998-5003 (2008). En general, esto indica que el enfoque basado en adyuvantes de Ad35K++ es útil para terapia de mAb más allá de la combinación con rituximab, como se ha demostrado adicionalmente en el Ejemplo 10.

10 En resumen, este estudio preclínico y los estudios *in vivo* descritos en el Ejemplo 3 demuestran la eficacia y seguridad del uso de Ad35K++ para potenciar rituximab y otra terapia anticancerígena basada en anticuerpos monoclonales.

### **EJEMPLO 10**

15 Este ejemplo demuestra que la preincubación de células tumorales con Ad35K++ mutante (Asp207Gly y Thr245Ala) sensibiliza a las células tumorales a la citólisis dependiente del complemento mediada por Campath/alemtuzumab, Herceptin, Erbitux, Mylotarg, Arzerra y Rituxan.

20 Base teórica: Se llevó a cabo un experimento para determinar si la proteína de botón de fibra de Ad35 mutante (Ad35K++) con afinidad potenciada por CD46 regularía por disminución CD46 sobre las siguientes células: células Raji (positivas para CD52), BT-474 (positivas para Her2/Neu) LOVO (positivas para EGFR), CD33+ y CD20+, y haría las células susceptibles a citólisis dependiente del complemento mediada por Campath/alemtuzumab (anti-CD52), Herceptin (anti-Her2/neu), Erbitux (anti-EGFR), Mylotarg (anti-CD33), Arzerra (anti-CD20) y Rituxan (anti-CD20).

#### ***Materiales y métodos***

25 ***Producción de proteínas de botón de fibra:*** Se seleccionaron proteínas de botón de fibra de Ad35 modificadas recombinantes con elevada afinidad por CD46 de una biblioteca de expresión en *E. coli* como se describe en el Ejemplo 1. Las proteínas de botón de fibra mutantes recombinantes se produjeron en *E. coli* con marcas del extremo N de seis residuos de histidina consecutivos (6-HIS) y se purificaron por cromatografía en agarosa Ni-NTA como se describe en el Ejemplo 1. Las proteínas de botón de fibra se dializaron contra Hepes 20 mM, NaCl 200 mM, 17 % de glicerol. Se realizaron pruebas de endotoxina usando el kit de prueba de lisado de amebocitos de Limulus de Cape Cod Inc. (E. Falboca, MA).

#### ***Líneas celulares:***

35 Se cultivó Raji (positivas para CD52) (linfoma de Burkitt humano) (ATCC CCL-86) en RPMI complementado con 10 % de FBS y con L-glutamina/ (Pen-Estrep).

40 Se cultivó Jurkat (negativas para CD52) en RPMI complementado con 10 % de FBS, Pen-Estrep.

Se cultivó BT-474 (positivas para Her2/Neu) (cáncer de mama humano) en medio de cuidado híbrido de ATCC (Cat n° 46-X), 10 % de FCS, Pen-Estrep.

45 Se cultivó MDA-231 (negativas para Her2/neu) (cáncer de mama humano) en DMEM, 10 % de FCS, Pen-Estrep.

Se cultivó LOVO (positivas para EGFR) (cáncer de colon humano) en DMEM, 10 % de FCS, Pen-Estrep.

50 Se cultivaron HeLa (negativas para EGFR) (Colección Americana de Cultivos Tipo, ATCC) en medio Eagle modificado con Dulbecco (DMEM) complementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS) y con L-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina.

#### ***Anticuerpos:***

55 Campath/alemtuzumab (anti-CD52), usado para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica, se obtuvo de Genzyme. Herceptin/trastuzumab (anti-Her2/neu), usado para el tratamiento de cáncer de mama, se obtuvo de Genentech. Erbitux/cetuximab (anti-EGFR), usado para el tratamiento de cáncer de colon, se obtuvo de Amgen. Mylotarg, Arzerra y Rituxan también se obtuvieron de fuentes comerciales.

#### ***Ensayos de viabilidad in vitro:***

##### ***1. Campath/alemtuzumab (anti-CD52)***

60 Se sembraron  $5 \times 10^4$  células/pocillo de células Raji (positivas para CD52) o Jurkat (negativas para CD52) por triplicado en placas de 96 pocillos con RPMI complementado con 10 % de FBS inactivado por calor, y se preincubaron con (1) PBS o (2) 25 µg/ml de Ad35K++ mutante (Asp207Gly y Thr245Ala) con alta afinidad por CD46.

Ocho horas después, se añadieron 15 µg/ml del mAb Campath (anti-CD52) a las células y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió suero humano normal (NHS) (25 % de concentración final de NHS) como fuente del complemento y las células se incubaron a 37 °C durante otras cuatro horas para la lisis. Las células viables en cada pocillo se contaron después de la tinción con azul de tripano. Cada muestra se llevó a cabo por triplicado y cada pocillo se contó cuatro veces. Se realizaron tres estudios independientes. La viabilidad celular de células sin tratar se consideró el 100 %.

## 2. Herceptin/trastuzumab (anti-Her2/neu)

Se sembraron  $5 \times 10^4$  células/pocillo de células BT-474 (positivas para Her2/neu) o MDA-231 (negativas para Her2/neu) por triplicado en placas de 96 pocillos con RPMI complementado con 10 % de FBS inactivado por calor, y se preincubaron con (1) PBS o (2) 25 µg/ml de Ad35K++ mutante (Asp207Gly y Thr245Ala) con alta afinidad por CD46.

Ocho horas después, se añadieron 15 µg/ml del mAb Herceptin (anti-Her2/neu) a las células y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió suero humano normal (NHS) (25 % de concentración final de NHS) como fuente del complemento y las células se incubaron a 37 °C durante otras cuatro horas para la lisis. Las células viables en cada pocillo se contaron después de la tinción con azul de tripano. Cada muestra se llevó a cabo por triplicado y cada pocillo se contó cuatro veces. Se realizaron tres estudios independientes. La viabilidad celular de células sin tratar se consideró el 100 %.

## 3. Erbitux/cetuximab (anti-EGFR)

Se sembraron  $5 \times 10^4$  células/pocillo de células LOVO (positivas para EGFR) o HeLa (negativas para EGFR) por triplicado en placas de 96 pocillos con RPMI complementado con 10 % de FBS inactivado por calor, y se preincubaron con (1) PBS o (2) 25 µg/ml de Ad35K++ mutante (Asp207Gly y Thr245Ala) con alta afinidad por CD46.

Ocho horas después, se añadieron 15 µg/ml del mAb Erbitux (anti-EGFR) a las células y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió suero humano normal (NHS) (25 % de concentración final de NHS) como fuente del complemento y las células se incubaron a 37 °C durante otras cuatro horas para la lisis. Las células viables en cada pocillo se contaron después de la tinción con azul de tripano. Cada muestra se llevó a cabo por triplicado y cada pocillo se contó cuatro veces. Se realizaron tres estudios independientes. La viabilidad celular de células sin tratar se consideró el 100 %.

## Resultados

Como se muestra en la FIGURA 9A, la pre-incubación con Ad35K++ potencia la destrucción mediada por CDC por Campath (mAb anti-CD52) de células Raji, que son positivas para CD52. A diferencia, como se muestra en la FIGURA 9B, la pre-incubación con Ad35K++ no tuvo un efecto sobre las células Jurkat (negativas para CD52) en presencia de Campath.

Como se muestra en la FIGURA 10A, la pre-incubación con Ad35K++ potencia tanto la destrucción dependiente como independiente de CDC por Herceptin (mAb anti-Her2/neu) de células BT-474, que son positivas para Her2/neu. A diferencia, como se muestra en la FIGURA 10B, la pre-incubación con Ad35K++ no tuvo un efecto sobre las células MDA-231 (negativas para Her2/neu) en presencia de Herceptin.

Como se muestra en la FIGURA 11A, la pre-incubación con Ad35K++ potencia la destrucción dependiente de CDC por Erbitux (mAb anti-EGFR) de células BT-474, que son positivas para EGFR. A diferencia, como se muestra en la FIGURA 11B, la pre-incubación con Ad35K++ no tuvo un efecto sobre células HeLa (negativas para EGFR) en presencia de Erbitux.

Por tanto, estos resultados demuestran que los métodos descritos en el presente documento para administrar Ad35K++ para sensibilizar células a CDC no se limitan a tratamientos con CD20/rituximab, y pueden aplicarse a sensibilizar células a CDC en el contexto de otros mAb anticancerígenos, por ejemplo, mAb anti-CD52, mAb anti-Her2/neu y mAb anti-EGFR.

Como se muestra en la FIGURA 12 y FIGURA 13, la pre-incubación con Ad35K++ potencia la destrucción por Mylotarg y Arzerra, respectivamente.

Como se muestra en la línea de tiempo en la FIGURA 14A, se incubaron células BT474 (células tumorales de cáncer de mama) con proteínas de Ad35K++ o de control. Once horas después, se añadieron mAb Herceptin a las células y se incubaron a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, se añadió suero humano normal (NHS) y las células viables se contaron 3 horas después basándose en exclusión con azul de tripano. En la FIGURA 14B se muestra la destrucción de células BT474 en presencia de dos muestras de suero diferentes (el panel izquierdo es suero del donante 1; el panel derecho es suero del donante 2). Se muestra el % de viabilidad celular de células por PBS (control), Herceptin/NHS y Herceptin/Ad35K++/NHS en presencia de las dos muestras de suero diferentes.

Como se muestra en la línea de tiempo en la FIGURA 14C, se incubaron células Farage positivas para CD20 de linfoma no Hodgkin (células de LNH) con proteínas Ad35K++ o de control. Once horas después, se añadieron mAb ofatumumab (Arzerra) a las células y se incubaron a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, se añadió suero humano normal (NHS) y las células viables se contaron 3 horas después basándose en exclusión con azul de tripano. En la FIGURA 14D se muestra la destrucción de las células Farage de LNH positivas para CD20 en presencia de dos muestras de suero diferentes (el panel izquierdo es suero grupo sanguíneo A del donante 1; el panel derecho es suero de grupo sanguíneo AB del donante 2). Se muestra el % de viabilidad celular de células por PBS (control), Arzerra/NHS y Arzerra/Ad35K++/NHS en presencia de las dos muestras de suero diferentes. Ad35K++ potencia la CDC desencadena por mAb con diferentes muestras de NHS, que incluyen suero AB.

Ambos donantes tuvieron anticuerpos neutralizantes contra Ad35 (título 1:16), pero el efecto de Ad35++ fue todavía significativo.

### **EJEMPLO 11**

Se optimizó la secuencia de AD35++ usando el software DNA2.0, como se muestra en la FIGURA 15A y la FIGURA 15B. Además de la optimización del uso de codones y la estructura de ARN, la secuencia de ADN de Ad35K++ se comprobó para motivos no deseados (FIGURA 15C). Se separaron lisados bacterianos por PAGE y se transfirieron. El filtro se incubó con CD46 recombinante soluble, seguido de incubación con anticuerpo anti-CD46 (clon J4.48; Fitzgerald, Concord, MA) y anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulina G (IgG) de ratón-peroxidasa de rábano picante (HRP) (BD Pharmingen, San Jose, CA). La FIGURA 15C muestra que además de la optimización del uso de codones y la estructura de ARN, la secuencia de ADN de Ad35K++ se comprobó para motivos no deseados.

Para detectar si la proteína optimizada se une a CD46, se cogieron colonias de pET29a-Ad35K++ o pQE30-Ad35K++ de placas recién cultivadas en línea y se cultivaron en 4 ml de medio LB a 30 °C durante 14 horas. Se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM y el cultivo se incubó a 37 °C bajo agitación vigorosa durante otras 8 horas. Entonces se sedimentaron bacterias por centrifugación, se resuspendieron en 350 ul de tampón de lisis (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 200 mM, imidazol 10 mM, pH 8,0), y se sometieron a sonicación. Se mezclaron 20 ul del sobrenadante de proteína con tampón de carga (Tris, DTT 50 mM, 1 % de SDS (1:1) (sin hervir) y se cargaron sobre un gel de 5-15 % de PAA. Después de la transferencia, los filtros se incubaron sucesivamente con CD46 soluble, mAb de ratón anti-CD46 (clon J4.48; Fitzgerald, Concord, MA) y anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón-HRP. La FIGURA 15D muestra la detección de Ad35K++ en HMS174 que contiene pET29-Ad35K++ después de la inducción por IPTG.

### **EJEMPLO 12**

A continuación, se examinó un modelo de primate no humano, como se muestra en la FIGURA 16. La FIGURA 16A muestra el agotamiento de linfocitos B *in vitro*. Específicamente, se purificaron PBMC de *Macaca fascicularis*, *Macaca nemestrina* y *Papio anubis* y se cultivaron durante un día. Se clasificaron células CD20+ usando un anticuerpo anti-CD20 humana-PE (reacción cruzada). Para ensayos de CDC, células CD20+ se incubaron con 25 ug/ml de Ad35K++ o PBS durante 12 horas. Se añadió rituximab (15 ug/ml) o PBS, seguido de NHS (20 % final) 30 min después. La viabilidad celular se contó después de 3 horas de incubación basándose en exclusión con azul de tripano. N=8 La FIGURA 16B muestra un ensayo de hemaglutinación de Ad35K++. Específicamente, se incubaron diluciones sucesivas de proteína Ad35K++ con 1 % de eritrocitos y la hemaglutinación se evaluó 1 hora después.

De todos los mamíferos, solo los NHP expresan la expresión de CD46 en un patrón similar a seres humanos. A diferencia de los seres humanos, los NHP tienen CD46 sobre los eritrocitos.

*In vitro*, Rituxan® agota los linfocitos B de CD20+ de todas las especies de NHP probadas (*Macaca fascicularis*, *Macaca nemestrina* y *Papio anubis*) y Ad35K++ potencia significativamente este proceso.

Ad35K++ hemaglutina eritrocitos de babuinos (*P. Anubis*), pero no eritrocitos de seres humanos y de especies de macaco, que incluyen *M. fascicularis* y *M. nemestrina*.

Tomados conjuntamente, estos resultados sugieren que *M. fascicularis* y *M. nemestrina* son modelos para estudiar tanto la eficacia y seguridad del enfoque de Ad35K++/Rituxan®, además de otras combinaciones de un polipéptido capaz de la modulación de la actividad o disminución de la presencia de una CRP sobre una superficie de célula diana en combinación con un anticuerpo terapéutico de elección.

### **EJEMPLO 13**

Ratones C57B1/6 que fueron dobles transgénicos para CD46 y CD20 humanas se inyectaron intravenosamente con células de mieloma 38C13 singénicas que expresaron ectópicamente CD46 y CD20 humanas a niveles encontrados sobre células de linfoma humano (FIGURA 17, panel inferior). Los ratones inyectados con PBS se volvieron moribundos en el día 17 después de la inyección de células 38C13 con células tumorales localizadas en la médula

ósea, bazo, ganglios linfáticos e hígado. En un experimento de terapia, los ratones portadores de tumor recibieron 2 mg/kg de Ad35K++ o PBS intravenosamente. Diez horas después los ratones se inyectaron con rituximab (2 mg/kg) y se monitorizó la supervivencia (N=5) (FIGURA 17, panel inferior).

5 **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> University of Washington Compliment Corporation Lieber, A. Wang, H. Berenson, R.J. Carter, D.

10 <120> Composiciones y métodos para modular la actividad de proteínas reguladoras del complemento en las células diana

<130> UWOTL-1-34458

15 <150> 61/255,450 <151> 2009-10-27

<150> 61/165,434 <151> 2009-03-31

<160> 32

20 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 972

<212> ADN

25 <213> Serotipo Adenovirus 35

<220>

<221> CDS

30 <222> (1)..(972)

<400> 1

35 atg acc aag aga gtc cgg ctc agt gac tcc ttc aac cct gtc tac ccc 48  
Met Thr Lys Arg Val Arg Leu Ser Asp Ser Phe Asn Pro Val Tyr Pro  
1 5 10 15

40 tat gaa gat gaa agc acc tcc caa cac ccc ttt ata aac cca ggg ttt 96  
Tyr Glu Asp Glu Ser Thr Ser Gln His Pro Phe Ile Asn Pro Gly Phe  
20 25 30

45 att tcc cca aat ggc ttc aca caa agc cca gac gga gtt ctt act tta 144  
Ile Ser Pro Asn Gly Phe Thr Gln Ser Pro Asp Gly Val Leu Thr Leu  
35 40 45

50 aaa tgt tta acc cca cta aca acc aca ggc gga tct cta cag cta aaa 192  
Lys Cys Leu Thr Pro Leu Thr Thr Thr Gly Gly Ser Leu Gln Leu Lys  
50 55 60

55 gtg gga ggg gga ctt aca gtg gat gac act gat ggt acc tta caa gaa 240  
Val Gly Gly Gly Leu Thr Val Asp Asp Thr Asp Gly Thr Leu Gln Glu  
65 70 75 80

60 aac ata cgt gct aca gca ccc att act aaa aat aat cac tct gta gaa 288  
Asn Ile Arg Ala Thr Ala Pro Ile Thr Lys Asn Asn His Ser Val Glu  
85 90 95

65 cta tcc att gga aat gga tta gaa act caa aac aat aaa cta tgt gcc 336  
Leu Ser Ile Gly Asn Gly Leu Glu Thr Gln Asn Asn Lys Leu Cys Ala  
100 105 110

65

ES 2 543 166 T3

	aaa	ttg	gga	aat	ggg	tta	aaa	ttt	aac	aac	ggt	gac	att	tgt	ata	aag	384
	Lys	Leu	Gly 115	Asn	Gly	Leu	Lys	Phe 120	Asn	Asn	Gly	Asp	Ile 125	Cys	Ile	Lys	
5	gat	agt	att	aac	acc	tta	tgg	act	gga	ata	aac	cct	cca	cct	aac	tgt	432
	Asp	Ser 130	Ile	Asn	Thr	Leu	Trp 135	Thr	Gly	Ile	Asn	Pro 140	Pro	Pro	Asn	Cys	
10	caa	att	gtg	gaa	aac	act	aat	aca	aat	gat	ggc	aaa	ctt	act	tta	gta	480
	Gln 145	Ile	Val	Glu	Asn	Thr 150	Asn	Thr	Asn	Asp	Gly 155	Lys	Leu	Thr	Leu	Val 160	
15	tta	gta	aaa	aat	gga	ggg	ctt	gtt	aat	ggc	tac	gtg	tct	cta	gtt	ggt	528
	Leu	Val	Lys	Asn	Gly 165	Gly	Leu	Val	Asn	Gly 170	Tyr	Val	Ser	Leu	Val 175	Gly	
20	gta	tca	gac	act	gtg	aac	caa	atg	ttc	aca	caa	aag	aca	gca	aac	atc	576
	Val	Ser	Asp	Thr 180	Val	Asn	Gln	Met	Phe 185	Thr	Gln	Lys	Thr	Ala 190	Asn	Ile	
25	caa	tta	aga	tta	tat	ttt	gac	tct	tct	gga	aat	cta	tta	act	gag	gaa	624
	Gln	Leu	Arg 195	Leu	Tyr	Phe	Asp	Ser 200	Ser	Gly	Asn	Leu	Leu 205	Thr	Glu	Glu	
30	tca	gac	tta	aaa	att	cca	ctt	aaa	aat	aaa	tct	tct	aca	gcg	acc	agt	672
	Ser	Asp 210	Leu	Lys	Ile	Pro	Leu 215	Lys	Asn	Lys	Ser	Ser 220	Thr	Ala	Thr	Ser	
35	gaa	act	gta	gcc	agc	agc	aaa	gcc	ttt	atg	cca	agt	act	aca	gct	tat	720
	Glu 225	Thr	Val	Ala	Ser	Ser 230	Lys	Ala	Phe	Met	Pro 235	Ser	Thr	Thr	Ala	Tyr 240	
40	ccc	ttc	aac	acc	act	act	agg	gat	agt	gaa	aac	tac	att	cat	gga	ata	768
	Pro	Phe	Asn	Thr 245	Thr	Thr	Arg	Asp	Ser	Glu 250	Asn	Tyr	Ile	His	Gly 255	Ile	
45	tgt	tac	tac	atg	act	agt	tat	gat	aga	agt	cta	ttt	ccc	ttg	aac	att	816
	Cys	Tyr	Tyr	Met 260	Thr	Ser	Tyr	Asp	Arg 265	Ser	Leu	Phe	Pro	Leu 270	Asn	Ile	
50	tct	ata	atg	cta	aac	agc	cg	atg	att	tct	tcc	aat	g	gcc	tat	gcc	864
	Ser	Ile	Met 275	Leu	Asn	Ser	Arg	Met 280	Ile	Ser	Ser	Asn	Val 285	Ala	Tyr	Ala	
55	ata	caa	ttt	gaa	tgg	aat	cta	aat	gca	agt	gaa	tct	cca	gaa	agc	aac	912
	Ile	Gln 290	Phe	Glu	Trp	Asn	Leu 295	Asn	Ala	Ser	Glu	Ser 300	Pro	Glu	Ser	Asn	
60	ata	gct	acg	ctg	acc	aca	tcc	ccc	ttt	ttc	ttt	tct	tac	att	aca	gaa	960
	Ile 305	Ala	Thr	Leu	Thr	Thr 310	Ser	Pro	Phe	Phe	Phe 315	Ser	Tyr	Ile	Thr	Glu 320	
65	gac	gac	aac	taa	972												
	Asp	Asp	Asn														
70	<210>	2	<211>	323													
75	<212>	PRT	<213>	Serotipo Adenovirus 35													
80	<400>	2															

ES 2 543 166 T3

1 Met Thr Lys Arg Val Arg Leu Ser Asp Ser Phe Asn Pro Val Tyr Pro  
 5 Tyr Glu Asp Glu Ser Thr Ser Gln His Pro Phe Ile Asn Pro Gly Phe  
 10 Ile Ser Pro Asn Gly Phe Thr Gln Ser Pro Asp Gly Val Leu Thr Leu  
 15 Lys Cys Leu Thr Pro Leu Thr Thr Thr Gly Gly Ser Leu Gln Leu Lys  
 20 Val Gly Gly Gly Leu Thr Val Asp Asp Thr Asp Gly Thr Leu Gln Glu  
 25 Asn Ile Arg Ala Thr Ala Pro Ile Thr Lys Asn Asn His Ser Val Glu  
 30 Leu Ser Ile Gly Asn Gly Leu Glu Thr Gln Asn Asn Lys Leu Cys Ala  
 35 Lys Leu Gly Asn Gly Leu Lys Phe Asn Asn Gly Asp Ile Cys Ile Lys  
 40 Asp Ser Ile Asn Thr Leu Trp Thr Gly Ile Asn Pro Pro Pro Asn Cys  
 45 Gln Ile Val Glu Asn Thr Asn Thr Asn Asp Gly Lys Leu Thr Leu Val  
 50 Leu Val Lys Asn Gly Gly Leu Val Asn Gly Tyr Val Ser Leu Val Gly  
 55 Val Ser Asp Thr Val Asn Gln Met Phe Thr Gln Lys Thr Ala Asn Ile  
 60 Gln Leu Arg Leu Tyr Phe Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Thr Glu Glu  
 65 Ser Asp Leu Lys Ile Pro Leu Lys Asn Lys Ser Ser Thr Ala Thr Ser  
 70 Glu Thr Val Ala Ser Ser Lys Ala Phe Met Pro Ser Thr Thr Ala Tyr  
 75 Pro Phe Asn Thr Thr Thr Arg Asp Ser Glu Asn Tyr Ile His Gly Ile

ES 2 543 166 T3

Cys Tyr Tyr Met Thr Ser Tyr Asp Arg Ser Leu Phe Pro Leu Asn Ile  
 260 265 270  
 5 Ser Ile Met Leu Asn Ser Arg Met Ile Ser Ser Asn Val Ala Tyr Ala  
 275 280 285  
 10 Ile Gln Phe Glu Trp Asn Leu Asn Ala Ser Glu Ser Pro Glu Ser Asn  
 290 295 300  
 15 Ile Ala Thr Leu Thr Thr Ser Pro Phe Phe Phe Ser Tyr Ile Thr Glu  
 305 310 315 320  
 Asp Asp Asn  
 20  
 <210> 3  
 <211> 201  
 <212> PRT  
 <213> Serotipo Adenovirus 35  
 25  
 <400> 3  
 30 Gly Asp Ile Cys Ile Lys Asp Ser Ile Asn Thr Leu Trp Thr Gly Ile  
 1 5 10 15  
 35 Asn Pro Pro Pro Asn Cys Gln Ile Val Glu Asn Thr Asn Thr Asn Asp  
 20 25 30  
 40 Gly Lys Leu Thr Leu Val Leu Val Lys Asn Gly Gly Leu Val Asn Gly  
 35 40 45  
 45 Tyr Val Ser Leu Val Gly Val Ser Asp Thr Val Asn Gln Met Phe Thr  
 50 55 60  
 50 Gln Lys Thr Ala Asn Ile Gln Leu Arg Leu Tyr Phe Asp Ser Ser Gly  
 65 70 75 80  
 55 Asn Leu Leu Thr Asp Glu Ser Asp Leu Lys Ile Pro Leu Lys Asn Lys  
 85 90 95  
 60 Ser Ser Thr Ala Thr Ser Glu Thr Val Ala Ser Ser Lys Ala Phe Met  
 100 105 110  
 65 Pro Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Asn Thr Thr Thr Arg Asp Ser Glu  
 115 120 125  
 70 Asn Tyr Ile His Gly Ile Cys Tyr Tyr Met Thr Ser Tyr Asp Arg Ser  
 130 135 140

ES 2 543 166 T3

Leu Phe Pro Leu Asn Ile Ser Ile Met Leu Asn Ser Arg Met Ile Ser  
 145 150 155 160

5 Ser Asn Val Ala Tyr Ala Ile Gln Phe Glu Trp Asn Leu Asn Ala Ser  
 165 170 175

10 Glu Ser Pro Glu Ser Asn Ile Ala Thr Leu Thr Thr Ser Pro Phe Phe  
 180 185 190

15 Phe Ser Tyr Ile Thr Glu Asp Asp Asn  
 195 200

<210> 4  
 <211> 611  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Derivado Sintético de Serotipo Adenovirus 35

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(606)

<400> 4

ggt gac att tgt ata aag gat agt att aac acc tta tgg act gga ata 48  
 Gly Asp Ile Cys Ile Lys Asp Ser Ile Asn Thr Leu Trp Thr Gly Ile  
 1 5 10 15

35 aac cct cca cct aac tgt caa att gtg gaa aac act aat aca aat gat 96  
 Asn Pro Pro Pro Asn Cys Gln Ile Val Glu Asn Thr Asn Thr Asn Asp  
 20 25 30

40 ggc aaa ctt act tta gta tta gta aaa aac gga ggg ctt gtt aat ggc 144  
 Gly Lys Leu Thr Leu Val Leu Val Lys Asn Gly Gly Leu Val Asn Gly  
 35 40 45

45 tac gtg tct cta gtt ggt gta tca gac act gtg aac caa atg ttc aca 192  
 Tyr Val Ser Leu Val Gly Val Ser Asp Thr Val Asn Gln Met Phe Thr  
 50 55 60

50 caa aag aca gca aac atc caa tta aga tta tat ttt gac tct tct gga 240  
 Gln Lys Thr Ala Asn Ile Gln Leu Arg Leu Tyr Phe Asp Ser Ser Gly  
 65 70 75 80

55 aat cta tta act ggt gaa tca gac tta aaa att cca ctt aaa aat aaa 288  
 Asn Leu Leu Thr Gly Glu Ser Asp Leu Lys Ile Pro Leu Lys Asn Lys  
 85 90 95

60 tct tct aca gcg acc agt gaa act gta gcc agc agc aaa gcc ttt atg 336  
 Ser Ser Thr Ala Thr Ser Glu Thr Val Ala Ser Ser Lys Ala Phe Met  
 100 105 110

60 cca agt act aca gct tat ccc ttc aac acc gct act agg gat agt gaa 384  
 Pro Ser Thr Ala Tyr Pro Phe Asn Thr Ala Thr Arg Asp Ser Glu  
 115 120 125

65

ES 2 543 166 T3

	aac tac att cat gga ata tgt tac tac atg act agt tat gat aga agt	432
	Asn Tyr Ile His Gly Ile Cys Tyr Tyr Met Thr Ser Tyr Asp Arg Ser	
	130 135 140	
5	cta ttt ccc ttg aac att tct ata atg ctg aac agc cgt atg att tct	480
	Leu Phe Pro Leu Asn Ile Ser Ile Met Leu Asn Ser Arg Met Ile Ser	
	145 150 155 160	
10	tcc aat gtt gcc tat gcc ata caa ttt gaa tgg aat cta aat gca agt	528
	Ser Asn Val Ala Tyr Ala Ile Gln Phe Glu Trp Asn Leu Asn Ala Ser	
	165 170 175	
15	gaa tct cca gaa agc aac ata gct acg ctg acc aca tcc ccc ttt ttc	576
	Glu Ser Pro Glu Ser Asn Ile Ala Thr Leu Thr Thr Ser Pro Phe Phe	
	180 185 190	
20	ttt tct tac att aca gaa gac gac aac taa gctta	611
	Phe Ser Tyr Ile Thr Glu Asp Asp Asn	
	195 200	
20	<210> 5	
	<211> 201	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Construcción Sintética	
30	<400> 5	
	Gly Asp Ile Cys Ile Lys Asp Ser Ile Asn Thr Leu Trp Thr Gly Ile	
	1 5 10 15	
35	Asn Pro Pro Pro Asn Cys Gln Ile Val Glu Asn Thr Asn Thr Asn Asp	
	20 25 30	
40	Gly Lys Leu Thr Leu Val Leu Val Lys Asn Gly Gly Leu Val Asn Gly	
	35 40 45	
45	Tyr Val Ser Leu Val Gly Val Ser Asp Thr Val Asn Gln Met Phe Thr	
	50 55 60	
50	Gln Lys Thr Ala Asn Ile Gln Leu Arg Leu Tyr Phe Asp Ser Ser Gly	
	65 70 75 80	
55	Asn Leu Leu Thr Gly Glu Ser Asp Leu Lys Ile Pro Leu Lys Asn Lys	
	85 90 95	
60	Ser Ser Thr Ala Thr Ser Glu Thr Val Ala Ser Ser Lys Ala Phe Met	
	100 105 110	
65	Pro Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Asn Thr Ala Thr Arg Asp Ser Glu	
	115 120 125	

ES 2 543 166 T3

Asn Tyr Ile His Gly Ile Cys Tyr Tyr Met Thr Ser Tyr Asp Arg Ser  
 130 135 140

5 Leu Phe Pro Leu Asn Ile Ser Ile Met Leu Asn Ser Arg Met Ile Ser  
 145 150 155 160

10 Ser Asn Val Ala Tyr Ala Ile Gln Phe Glu Trp Asn Leu Asn Ala Ser  
 165 170 175

15 Glu Ser Pro Glu Ser Asn Ile Ala Thr Leu Thr Thr Ser Pro Phe Phe  
 180 185 190

20 Phe Ser Tyr Ile Thr Glu Asp Asp Asn  
 195 200

<210> 6  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Sintética

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Donde Xaa en la posición 9 es o "D" (de tipo salvaje) o "G" (mutante)

<400> 6

Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Thr Xaa Glu Ser Asp Leu Lys Ile Pro  
 1 5 10 15

Leu

<210> 7  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Sintética

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (23)..(23)  
 <223> Donde Xaa en la posición 23 es o "T" (de tipo salvaje) o "A" (mutante)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Donde Xaa en la posición 34 es o "I" (de tipo salvaje) o "L" (mutante)

<400> 7

65

ES 2 543 166 T3

Thr Ser Glu Thr Val Ala Ser Ser Lys Ala Phe Met Pro Ser Thr Thr  
 1 5 10 15  
 5 Ala Tyr Pro Phe Asn Thr Xaa Thr Arg Asp Ser Glu Asn Tyr Ile His  
 20 25 30  
 10 Gly Xaa  
 <210> 8  
 <211> 12  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Sintética  
 20 <400> 8  
 Leu Asn Ser Arg Met Ile Ser Ser Asn Val Ala Tyr  
 1 5 10  
 25 <210> 9  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 30 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 9  
 35 Ala Ser Glu Ser Pro Glu Ser Asn Ile Ala Thr Leu Thr Thr Ser Pro  
 1 5 10 15  
 40 Phe  
 <210> 10  
 <211> 34  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Sintética derivada de Serotipo Adenovirus 35  
 50 <400> 10  
 ttaaggatc cggtagacatt tgtataaagg atag 34  
 55 <210> 11  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 60 <223> Sintética derivada de Serotipo Adenovirus35  
 <400> 11  
 tatataagct tagttgctgt ctctgtaat 30  
 65 <210> 12

ES 2 543 166 T3

<211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Sintética derivada de Serotipo Adenovirus35

<400> 12

10 cgtcagcagc gatccgggta catttgata aaggatagta ttaacacctt atggactgga 60

<210> 13  
 <211> 32  
 <212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Sintética derivada de Serotipo Adenovirus35

20 <400> 13

ccaagctcag ctaattaagc ttagtgtcgc tc 32

25 <210> 14  
 <211> 369  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30 <400> 14

Met Glu Pro Pro Gly Arg Arg Glu Cys Pro Phe Pro Ser Trp Arg Phe  
 1 5 10 15

35 Pro Gly Leu Leu Leu Ala Ala Met Val Leu Leu Leu Tyr Ser Phe Ser  
 20 25 30

40 Asp Ala Cys Glu Glu Pro Pro Thr Phe Glu Ala Met Glu Leu Ile Gly  
 35 40 45

45 Lys Pro Lys Pro Tyr Tyr Glu Ile Gly Glu Arg Val Asp Tyr Lys Cys  
 50 55 60

50 Lys Lys Gly Tyr Phe Tyr Ile Pro Pro Leu Ala Thr His Thr Ile Cys  
 65 70 75 80

55 Asp Arg Asn His Thr Trp Leu Pro Val Ser Asp Asp Ala Cys Tyr Arg

60

65

ES 2 543 166 T3

	85					90					95					
5	Glu	Thr	Cys	Pro 100	Tyr	Ile	Arg	Asp	Pro 105	Leu	Asn	Gly	Gln	Ala 110	Val	Pro
10	Ala	Asn	Gly 115	Thr	Tyr	Glu	Phe	Gly 120	Tyr	Gln	Met	His	Phe 125	Ile	Cys	Asn
15	Glu	Gly 130	Tyr	Tyr	Leu	Ile	Gly 135	Glu	Glu	Ile	Leu	Tyr 140	Cys	Glu	Leu	Lys
20	Gly 145	Ser	Val	Ala	Ile	Trp 150	Ser	Gly	Lys	Pro	Pro 155	Ile	Cys	Glu	Lys	Val 160
25	Leu	Cys	Thr	Pro	Pro 165	Pro	Lys	Ile	Lys	Asn 170	Gly	Lys	His	Thr	Phe 175	Ser
30	Glu	Val	Glu	Val 180	Phe	Glu	Tyr	Leu	Asp 185	Ala	Val	Thr	Tyr	Ser 190	Cys	Asp
35	Pro	Ala	Pro 195	Gly	Pro	Asp	Pro	Phe 200	Ser	Leu	Ile	Gly	Glu 205	Ser	Thr	Ile
40	Tyr	Cys 210	Gly	Asp	Asn	Ser	Val 215	Trp	Ser	Arg	Ala	Ala 220	Pro	Glu	Cys	Lys
45	Val 225	Val	Lys	Cys	Arg	Phe 230	Pro	Val	Val	Glu	Asn 235	Gly	Lys	Gln	Ile	Ser 240
50	Gly	Phe	Gly	Lys	Lys 245	Phe	Tyr	Tyr	Lys	Ala 250	Thr	Val	Met	Phe	Glu 255	Cys
55	Asp	Lys	Gly	Phe 260	Tyr	Leu	Asp	Gly	Ser 265	Asp	Thr	Ile	Val	Cys 270	Asp	Ser
60	Asn	Ser	Thr 275	Trp	Asp	Pro	Pro	Val 280	Pro	Lys	Cys	Leu	Lys 285	Gly	Pro	Arg
65	Pro	Thr 290	Tyr	Lys	Pro	Pro	Val 295	Ser	Asn	Tyr	Pro	Gly 300	Tyr	Pro	Lys	Pro
70	Glu 305	Glu	Gly	Ile	Leu	Asp 310	Ser	Leu	Asp	Val	Trp 315	Val	Ile	Ala	Val	Ile 320
75	Val	Ile	Ala	Ile	Val 325	Val	Gly	Val	Ala	Val 330	Ile	Cys	Val	Val	Pro 335	Tyr

ES 2 543 166 T3

Arg Tyr Leu Gln Arg Arg Lys Lys Lys Gly Lys Ala Asp Gly Gly Ala  
 340 345 350

5 Glu Tyr Ala Thr Tyr Gln Thr Lys Ser Thr Thr Pro Ala Glu Gln Arg  
 355 360 365

10 Gly

<210> 15  
 <211> 17  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Sintética

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> En donde Xaa en la posición 9 es cualquier aminoácido; o D (tipo salvaje); o G (mutante); o E (sustitución conservadora)

25 <400> 15

30 Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Thr Xaa Glu Ser Asp Leu Lys Ile Pro  
 1 5 10 15

Leu

35 <210> 16  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> Sintética

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 45 <222> (6)..(6)  
 <223> En donde Xaa en la posición 6 es cualquier aminoácido; o D (tipo salvaje); o G (mutante); o E (sustitución conservadora)

<400> 16

50 Gly Asn Leu Leu Thr Xaa Glu Ser Asp Leu Lys  
 1 5 10

<210> 17  
 <211> 9  
 55 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Sintética

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 65 <223> En donde Xaa en la posición 5 es cualquier aminoácido; o D (tipo salvaje); o G (mutante); o E (sustitución conservadora)



ES 2 543 166 T3

- <210> 21  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Sintética  
 <220>  
 10 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> En donde Xaa en la posición 6 es cualquier aminoácido; o D (tipo salvaje); o G (mutante); o E (sustitución conservadora)  
 15 <400> 21  
 Gly Asn Leu Leu Thr Xaa Glu Ser  
 1 5  
 <210> 22  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> Sintética  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 25 <223> En donde Xaa en la posición 6 es cualquier aminoácido; o  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 30 <223> En donde Xaa en la posición 6 es cualquier aminoácido; o  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 35 <223> En donde Xaa en la posición 6 es D (tipo salvaje); o  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 40 <223> En donde Xaa en la posición 6 es G (mutante); o  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 45 <223> En donde Xaa en la posición 6 es E (sustitución conservadora)  
 <400> 22  
 Gly Asn Leu Leu Thr Xaa  
 1 5  
 50 <210> 23  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> Sintética  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (23)..(23)  
 60 <223> En donde Xaa en la posición 23 es cualquier aminoácido; o T (tipo salvaje); o A (mutante); o es C, G, N, Q, S, o Y; o es F, I, L, M, P, V, W o  
 65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE

ES 2 543 166 T3

<222> (34)..(34)

<223> En donde Xaa en la posición 34 es cualquier aminoácido; o I (de tipo salvaje); o L (mutante); o es A, F, M, P, V o W

5 <400> 23

Thr Ser Glu Thr Val Ala Ser Ser Lys Ala Phe Met Pro Ser Thr Thr  
1 5 10 15

10

Ala Tyr Pro Phe Asn Thr Xaa Thr Arg Asp Ser Glu Asn Tyr Ile His  
20 25 30

15

Gly Xaa

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintética

25

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> En donde Xaa en la posición 4 es cualquier aminoácido; o T (tipo salvaje); o A (mutante); o es C, G, N, Q, S, o Y; o es F, I, L, M, P, V, W o

30

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> En donde Xaa en la posición 15 es cualquier aminoácido; o I (de tipo salvaje); o L (mutante); o es A, F, M, P, V o W

35

<400> 24

Phe Asn Thr Xaa Thr Arg Asp Ser Glu Asn Tyr Ile His Gly Xaa  
1 5 10 15

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintética

50

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> En donde Xaa en la posición 4 es cualquier aminoácido; o T (tipo salvaje); o A (mutante); o es C, G, N, Q, S, o Y; o es F, I, L, M, P, V, W o

55

<400> 25

Phe Asn Thr Xaa Thr Arg Asp  
1 5

60

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

65 <213> Secuencia Artificial

ES 2 543 166 T3

<220>  
 <223> Sintética

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> En donde Xaa en la posición 3 es cualquier aminoácido; o T (tipo salvaje); o A (mutante); o es C, G, N, Q, S, o Y; o es F, I, L, M, P, V, W o

10 <400> 26

Asn Thr Xaa Thr Arg  
 1 5

15 <210> 27  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> En donde Xaa en la posición 2 es cualquier aminoácido; o T (tipo salvaje); o A (mutante); o es C, G, N, Q, S, o Y; o es F, I, L, M, P, V, W o

30 <400> 27

Thr Xaa Thr  
 1

35 <210> 28  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> Sintética

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> En donde Xaa en la posición 1 es cualquier aminoácido; o T (tipo salvaje); o A (mutante); o es C, G, N, Q, S, o Y; o es F, I, L, M, P, V, W o

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> En donde Xaa en la posición 12 es cualquier aminoácido; o I (de tipo salvaje); o L (mutante); o es A, F, M, P, V o W

55 <400> 28

Xaa Thr Arg Asp Ser Glu Asn Tyr Ile His Gly Xaa  
 1 5 10

60 <210> 29  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>

ES 2 543 166 T3

<223> Sintética

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
5 <222> (11) .. (11)  
<223> En donde Xaa en la posición 11 es cualquier aminoácido; o I (de tipo salvaje); o L (mutante); o es A, F, M. P, V o W

<400> 29

10  
 Thr Arg Asp Ser Glu Asn Tyr Ile His Gly Xaa  
 1 5 10

15 <210> 30  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Sintética

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
25 <222> (5) .. (5)  
<223> En donde Xaa en la posición 5 es cualquier aminoácido; o I (de tipo salvaje); o L (mutante); o es A, F, M. P, V o W

<400> 30

30 Tyr Ile His Gly Xaa  
 1 5

<210> 31  
<211> 3  
35 <212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Sintética  
40 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> En donde Xaa en la posición 3 es cualquier aminoácido; o I (de tipo salvaje); o L (mutante); o es A, F, M. P, V o W

45 <400> 31  
 His Gly Xaa  
 1

50 <210> 32  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

55 <220>  
<223> Sintética  
<400> 32

60 Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val Arg Lys  
 1 5 10 15

65 Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu  
 20 25

**Reivindicaciones**

1. Un polipéptido modificado que puede trimerizar y reducir la actividad, cantidad o densidad de una proteína reguladora del complemento (CRP) sobre una superficie de célula diana, en el que el polipéptido tiene al menos el 90 % de identidad de secuencias con la secuencia de botón de fibra de Ad35 de SEC ID N°: 3 e incluye los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 123-134 de SEC ID N°: 2, o sustituciones conservativas de los mismos, en el que el polipéptido incluye adicionalmente los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 242, 279, 282 y 302 de SEC ID N°: 2, y en el que el polipéptido comprende un primer dominio y un segundo dominio con afinidad de unión por CRP, en el que el primer dominio comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 22, SEC ID N°: 23, SEC ID N°: 24, SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 26, SEC ID N°: 27, SEC ID N°: 28, SEC ID N°: 29, SEC ID N°: 30 o SEC ID N°: 31, y en la que X<sub>1</sub> no es aspartato, X<sub>2</sub> no es treonina o X<sub>3</sub> no es isoleucina.
2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que la CRP es una proteína transmembranaria, o, en el que la CRP es CD46, CD55, CD59 o CD35.
3. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que la célula diana es una célula tumoral o un linfocito B que expresa CD20.
4. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el primer dominio comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 19, en la que X<sub>1</sub> no es aspartato; SEC ID N°: 26, en la que X<sub>2</sub> no es treonina; o SEC ID N°: 31, en la que X<sub>3</sub> no es isoleucina.
5. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el segundo dominio comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 19, en la que X<sub>1</sub> no es aspartato; SEC ID N°: 26, en la que X<sub>2</sub> no es treonina; o SEC ID N°: 31, en la que X<sub>3</sub> no es isoleucina.
6. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6 que comprende además un segundo agente terapéutico, en la que el segundo agente terapéutico está opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en una proteína, un polipéptido, una molécula pequeña, un fármaco, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo híbrido, un conjugado de anticuerpo-fármaco, un ARNip, un ARN antisentido, un miARN, un virus y un aptámero, o, en la que el segundo agente terapéutico está opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente citostático, un agente de quimioterapia, un agente de activación del complemento, un modulador de la expresión de CRP, radiación, un agente inmunomodulador, un agente pro-apoptótico, un inhibidor de la proteína de choque térmico, un inhibidor de la proteasa, un agente desialilante, un inhibidor de MMP y un inhibidor de PKC.
8. Un vector que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
9. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el polipéptido comprende un polipéptido del dominio de botón de fibra modificado que comprende al menos 12 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 3, en el que el polipéptido incluye al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Asp207Gly, Thr245Ala e Ile256Leu, o una combinación de las mismas, y en el que el polipéptido puede formar homotrímeros que pueden unirse a CD46.
10. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 ó 9, en la que dicho polipéptido comprende un polipéptido del dominio de botón de fibra modificado que comprende al menos 40 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 3.
11. Una composición para reducir los niveles en la superficie celular de CD46, que comprende:
- (a) una cantidad de un agente eficaz para reducir los niveles en la superficie celular de CD46, comprendiendo el agente una pluralidad del polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 ó 9, en el que dicho polipéptido comprende un dominio de botón de fibra de adenovirus modificado, en el que el dominio de botón de fibra de adenovirus modificado puede formar homotrímeros que tienen afinidad potenciada por unirse a CD46 en comparación con homotrímeros formados a partir de una pluralidad de polipéptidos que consiste en SEC ID N°: 3, y
  - (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. Un kit que comprende:
- (a) el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 ó 9; y

(b) un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a un antígeno sobre la superficie de una célula de mamífero e induce la citólisis dependiente del complemento.

5 13. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 6-7 ó 11 para su uso en un método para tratar un sujeto con cáncer, en la que el polipéptido de la composición comprende fenilalanina (Phe) en la posición 242, arginina (Arg) en la posición 279, serina (Ser) en la posición 282 y ácido glutámico (Glu) en la posición 302, y en la que el método comprende administrar al sujeto la composición.

10 14. Un agente que comprende una pluralidad de polipéptidos del dominio de botón de fibra de adenovirus modificados como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en un método de potenciar el efecto de un agente terapéutico de anticuerpo en el tratamiento de cáncer, comprendiendo el método:

15 (a) administrar al menos una vez al sujeto mamífero una cantidad del agente que comprende una pluralidad de polipéptidos del dominio de botón de fibra de adenovirus modificados como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y que comprende fenilalanina (Phe) en la posición 242, arginina (Arg) en la posición 279, serina (Ser) en la posición 282 y ácido glutámico (Glu) en la posición 302, eficaz para reducir la cantidad de CD46 presente sobre la superficie de una célula diana; y

20 (b) administrar al menos una vez una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico de anticuerpo al sujeto, en el que el agente terapéutico de anticuerpo se une a un antígeno de superficie de células no CD46 expresado sobre la célula diana.

25

30

35

40

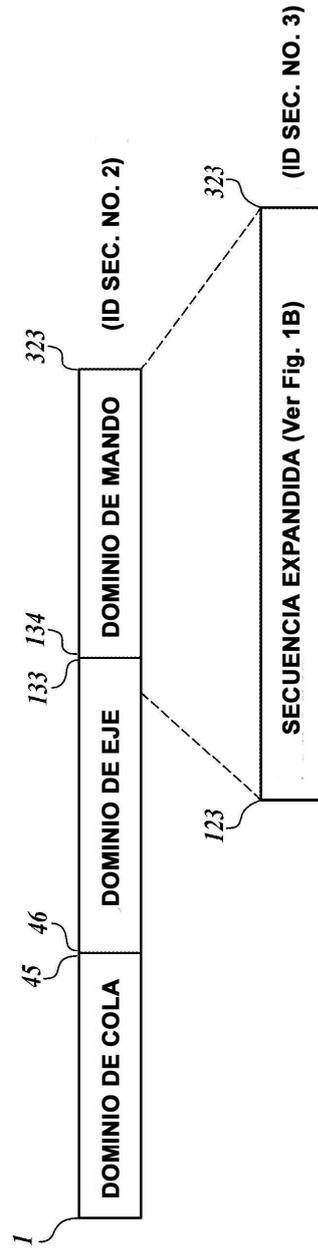
45

50

55

60

65



**FIG. 1A**

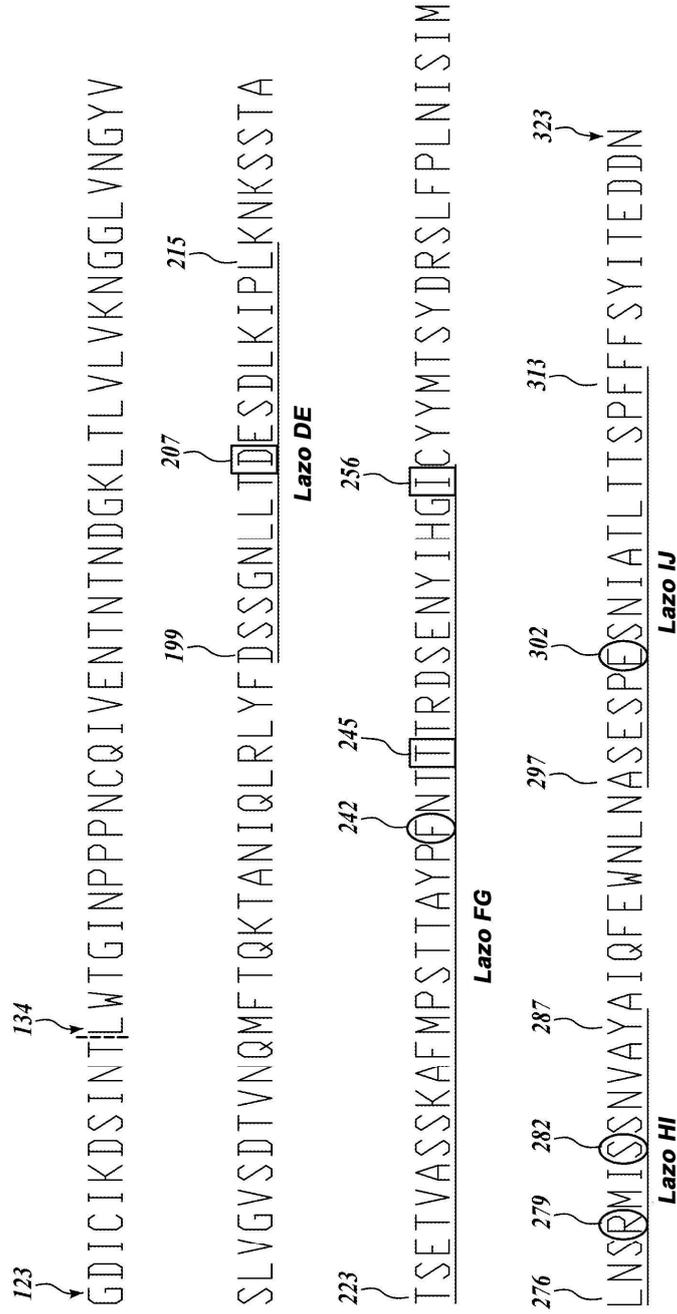


FIG. 1B

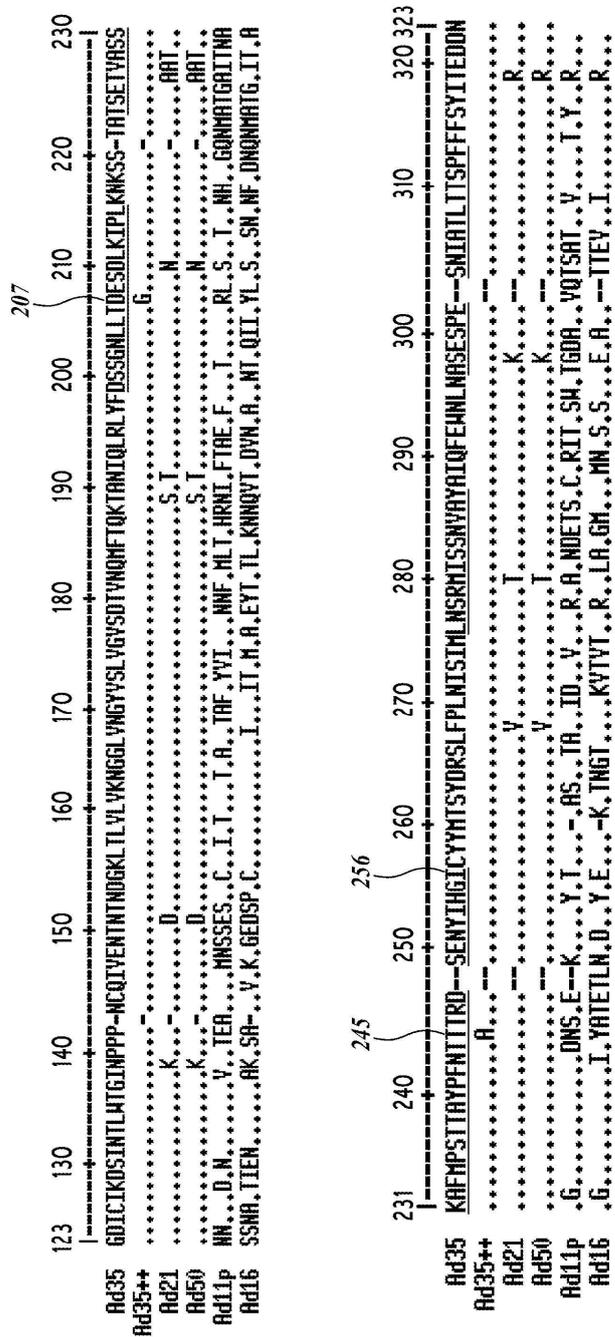
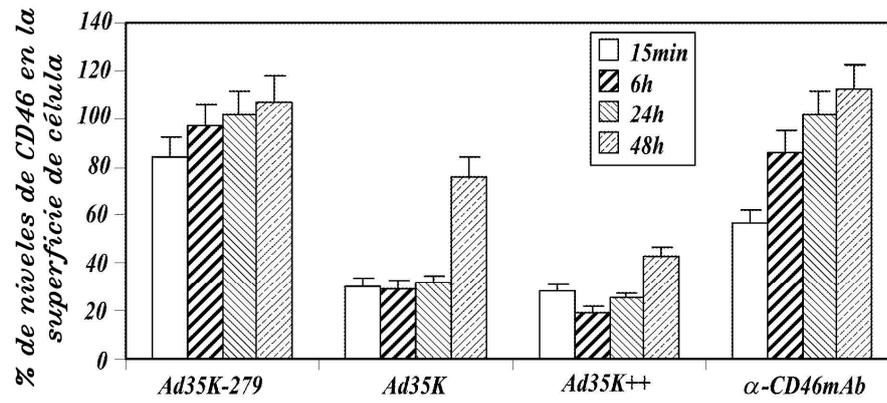
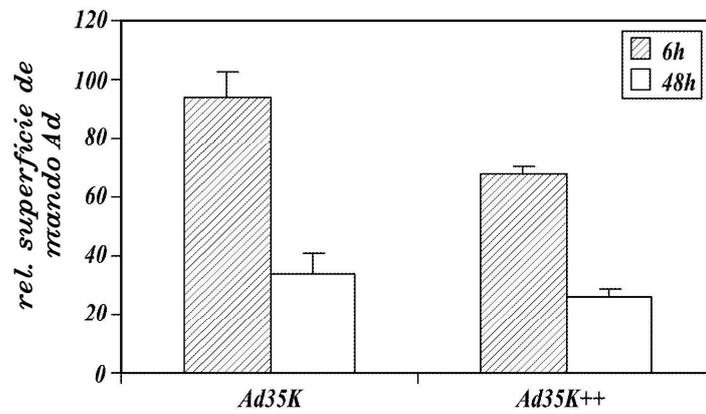


FIG. 1C



**FIG. 2A**



**FIG. 2B**

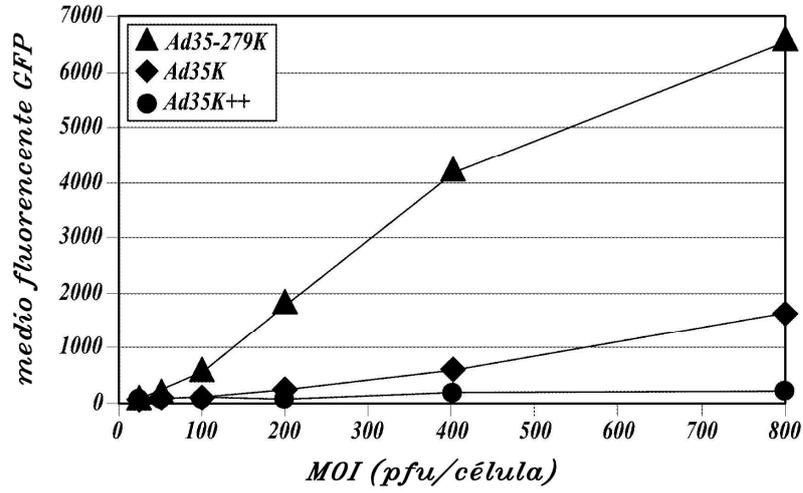


FIG. 2C

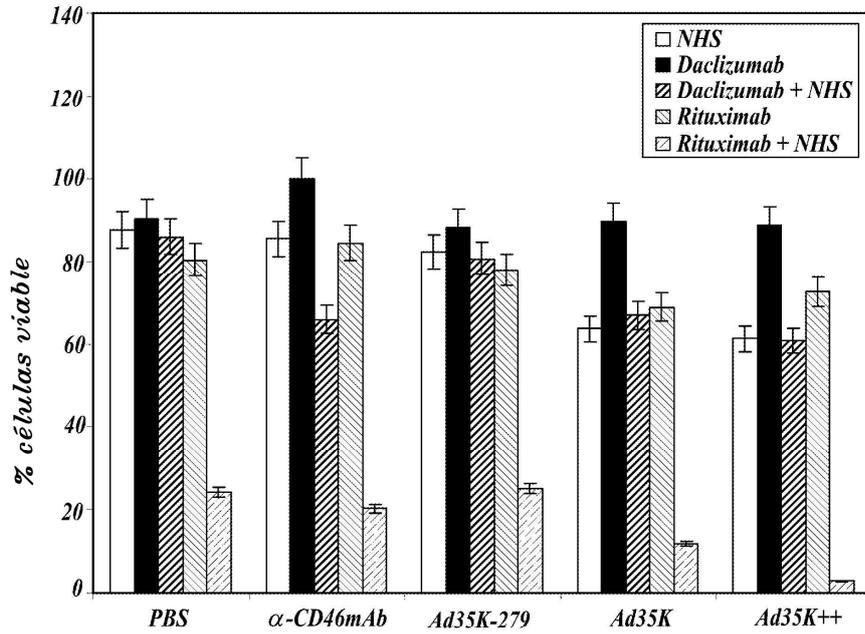


FIG. 3

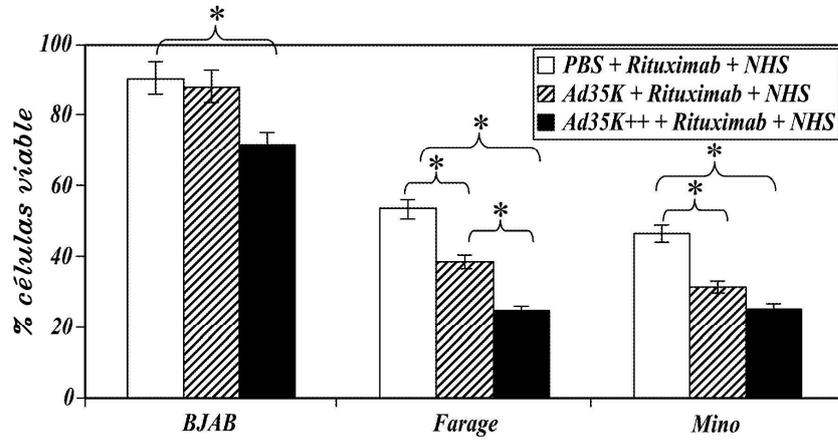


FIG. 4A

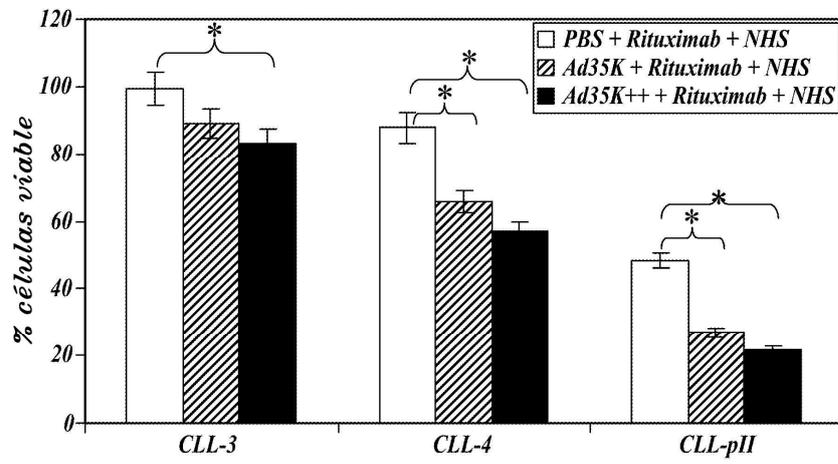
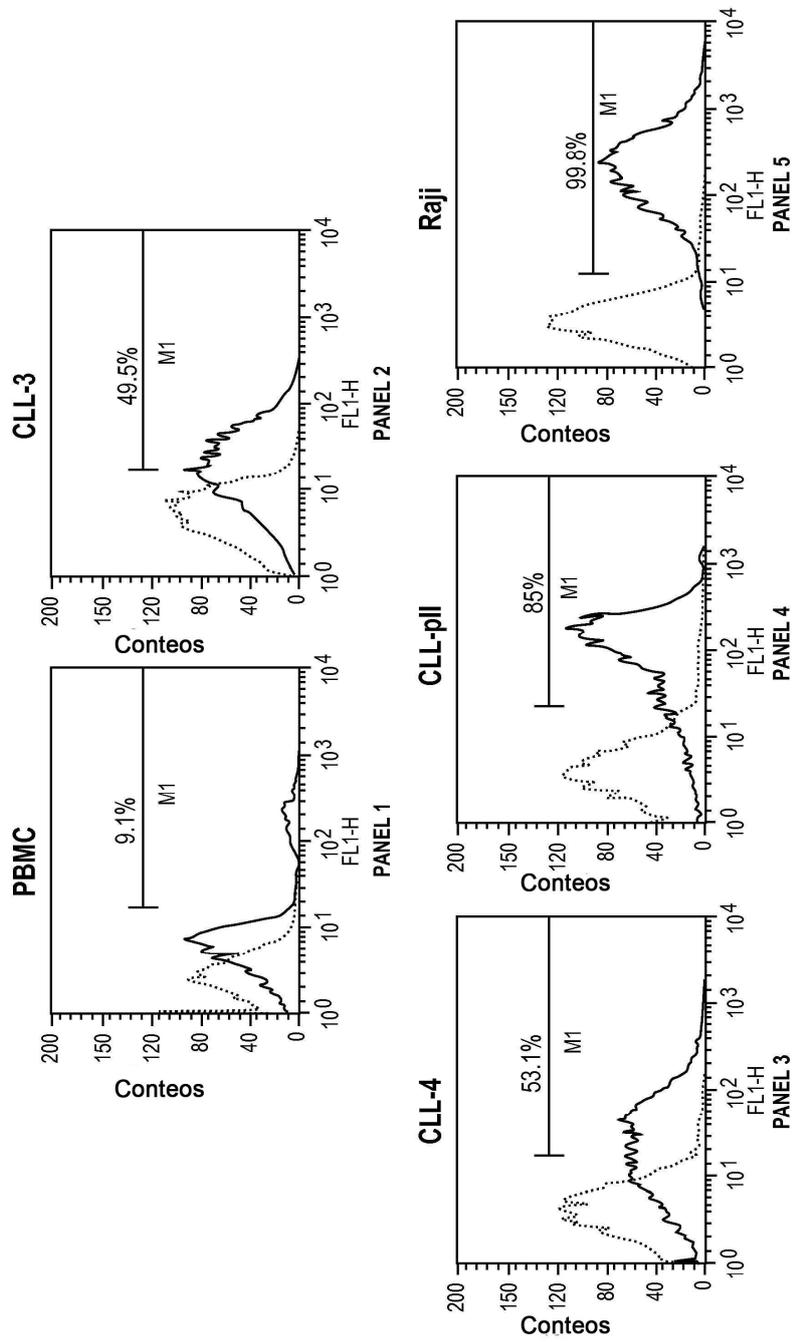
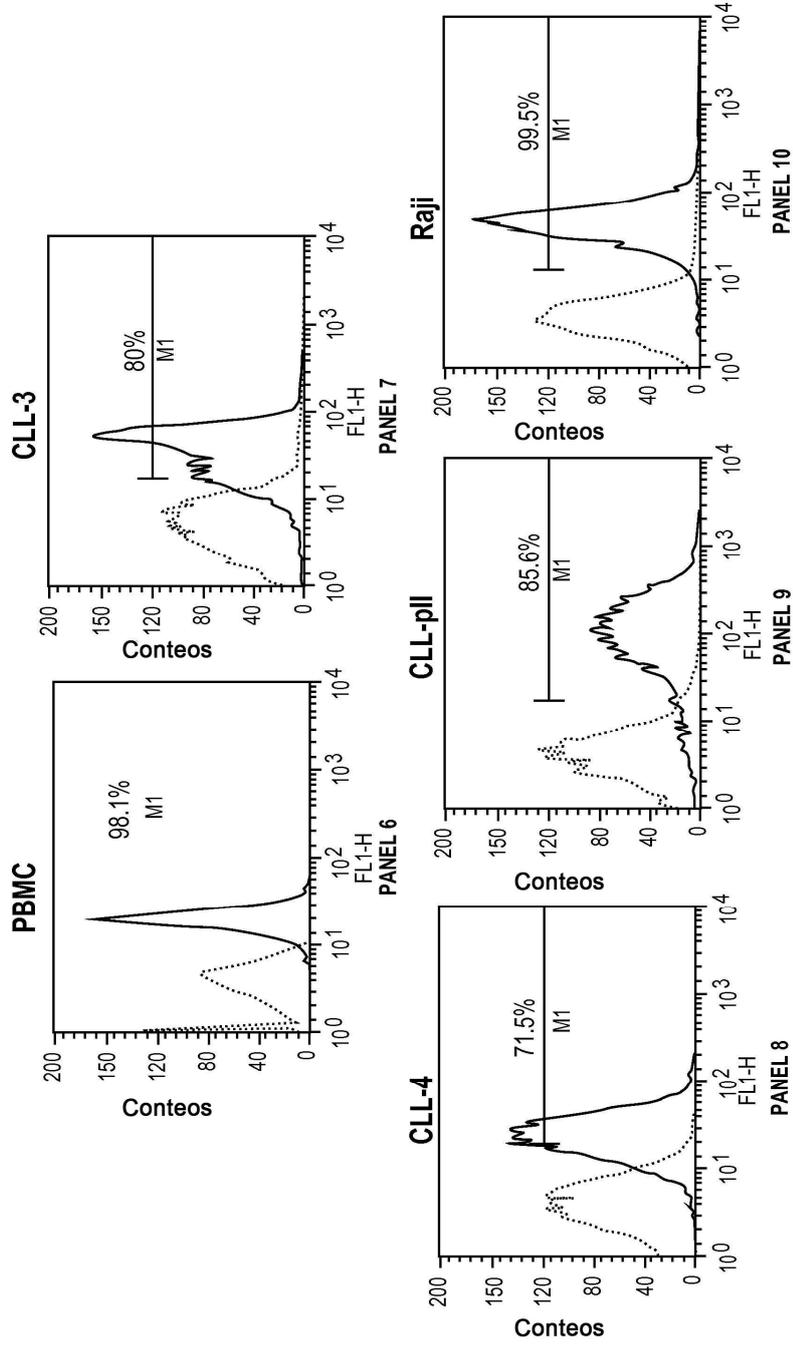


FIG. 4B



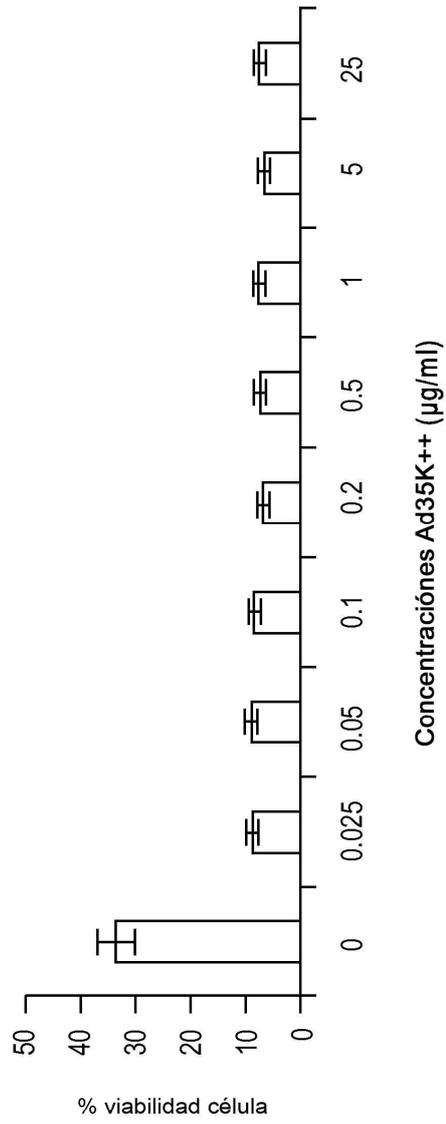
Niveles de CD20 evaluados como Citometria de flujo

**FIG. 4C**



Niveles de CD46 evaluados como Citometria de Flujo

**FIG. 4C (CONT.)**



**FIG. 4D**

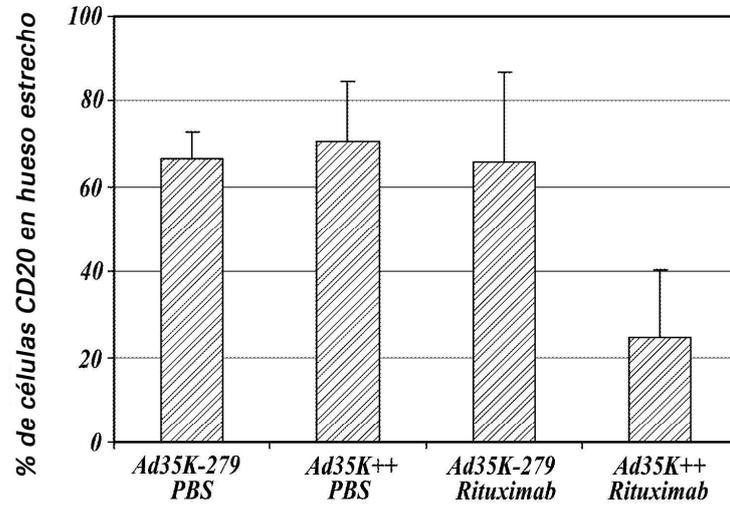


FIG. 5A

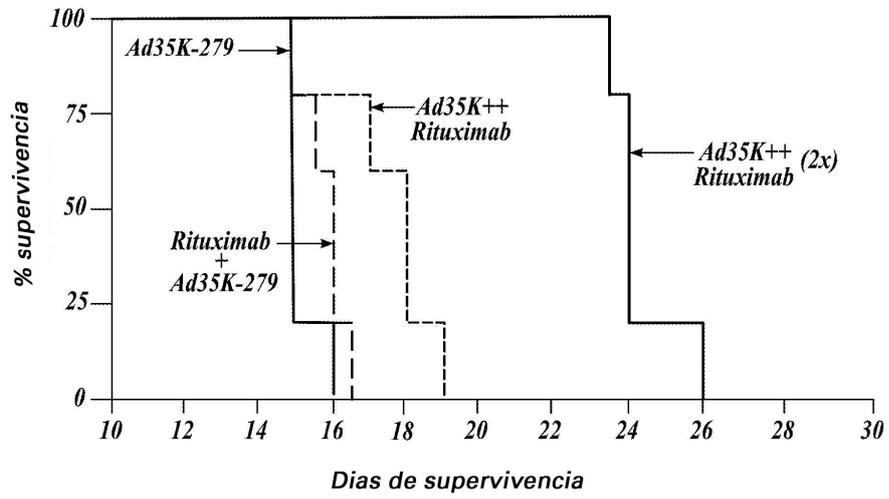
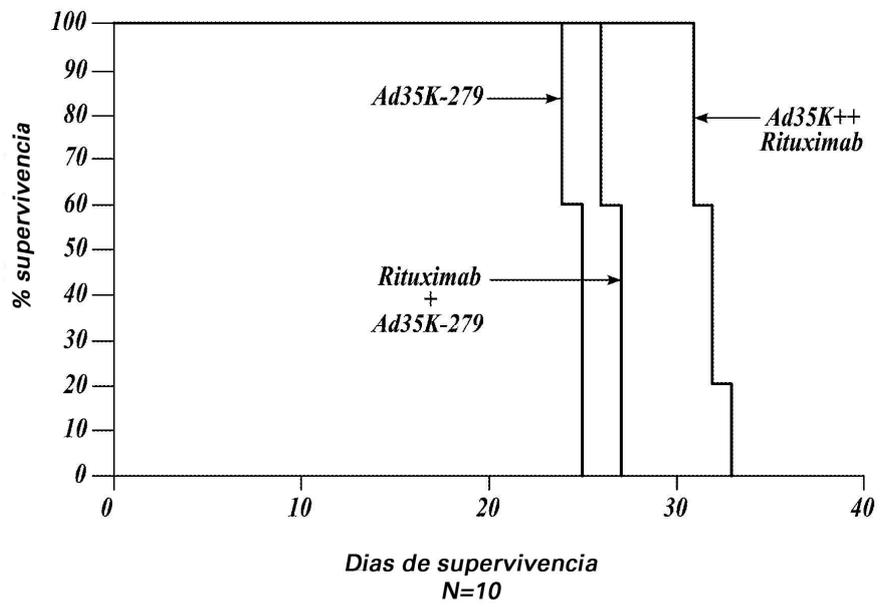
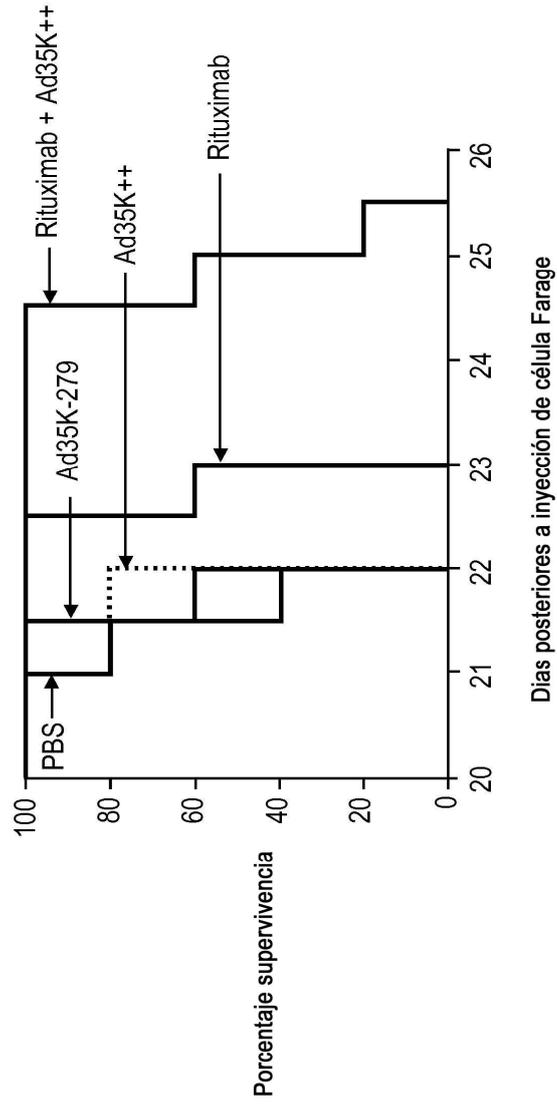


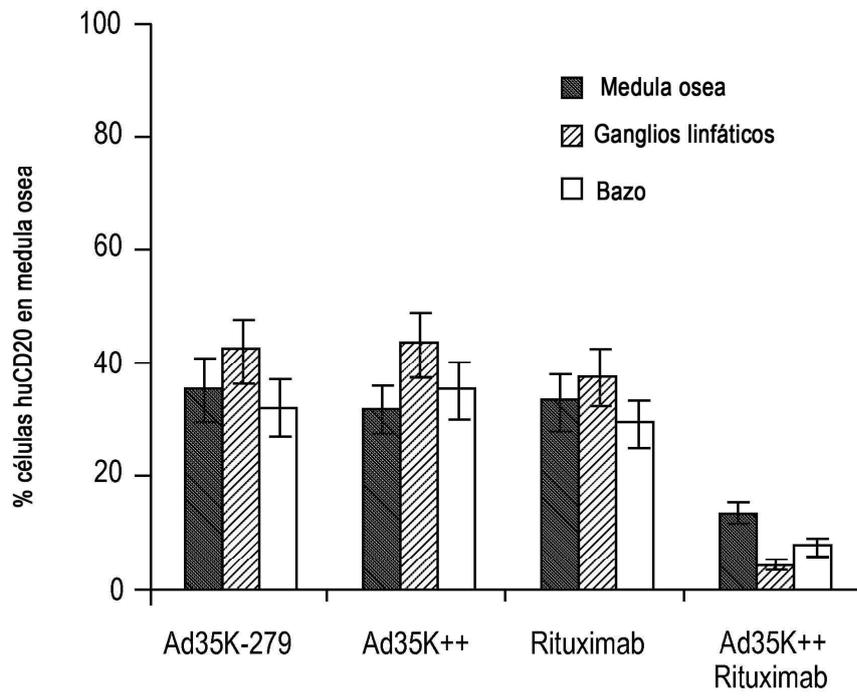
FIG. 5B



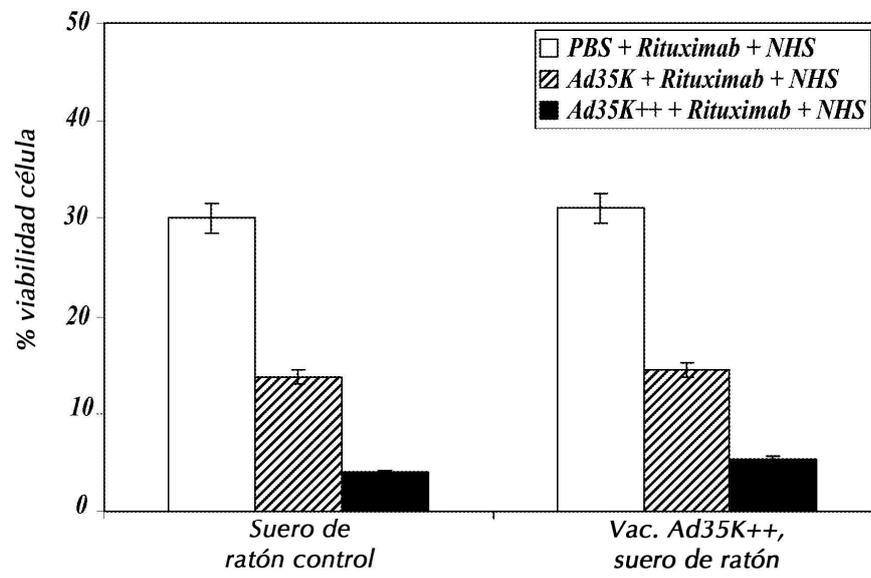
**FIG. 5C**



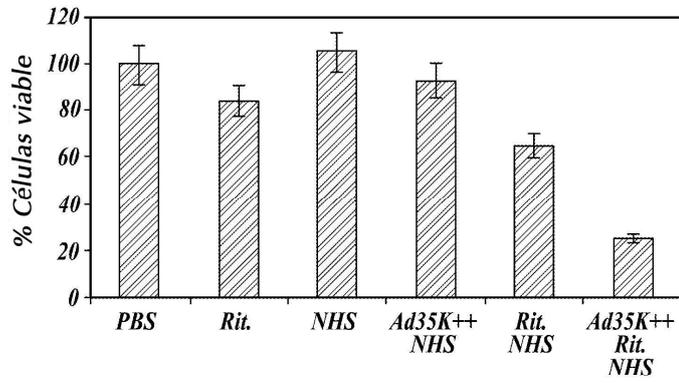
**FIG. 5D**



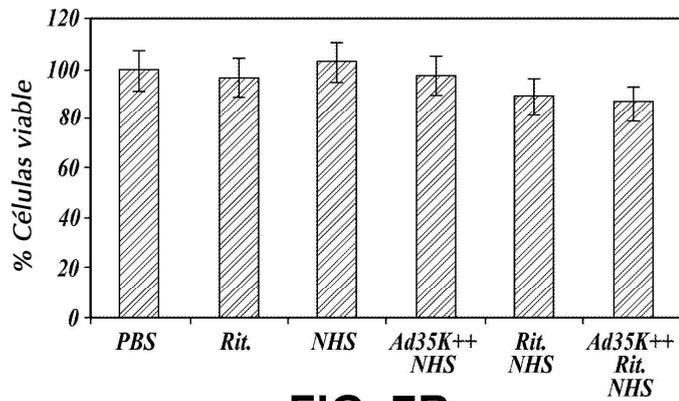
**FIG. 5E**



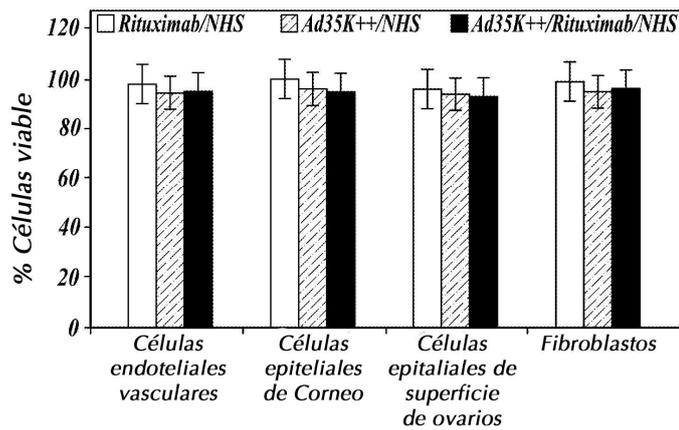
**FIG. 6**



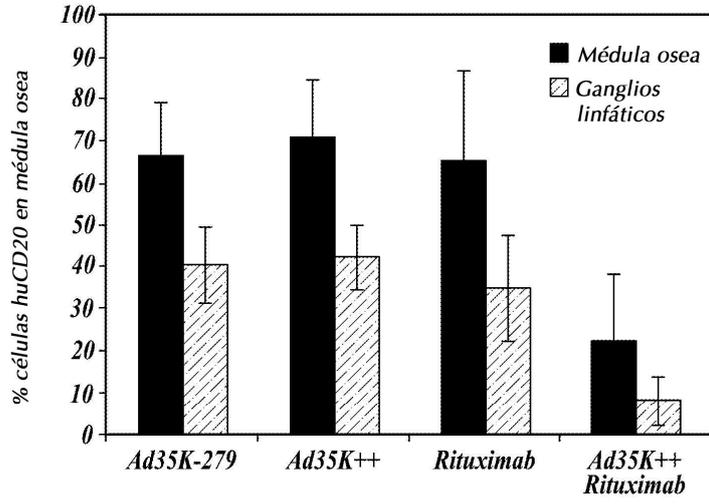
**FIG. 7A**



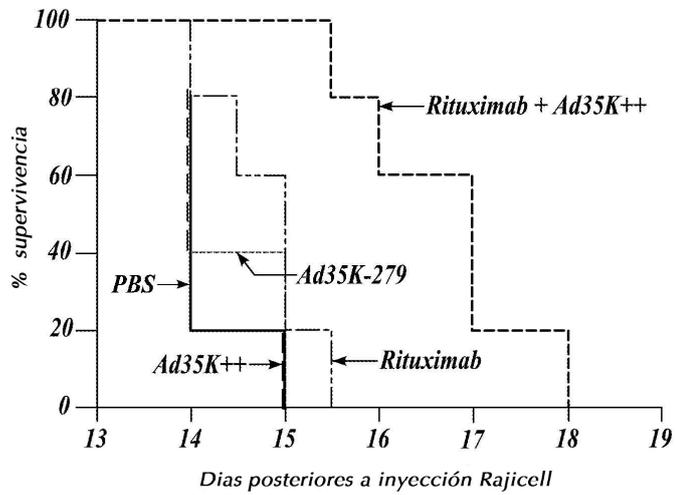
**FIG. 7B**



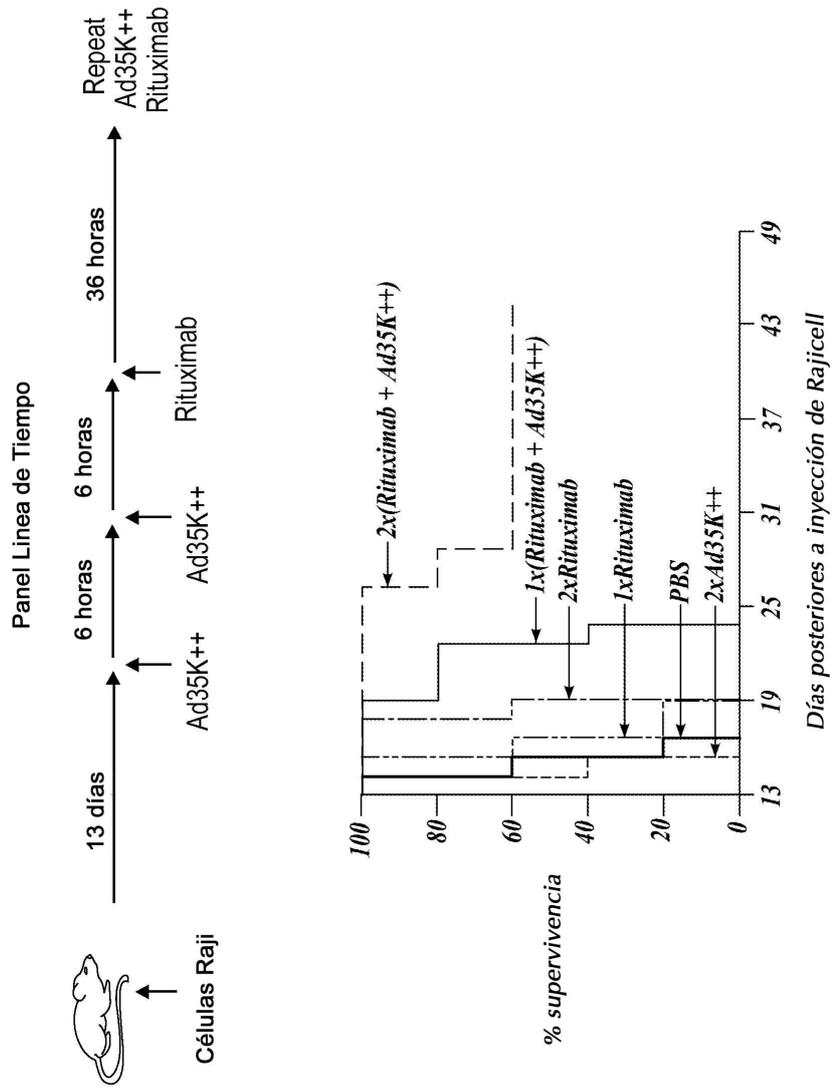
**FIG. 7C**



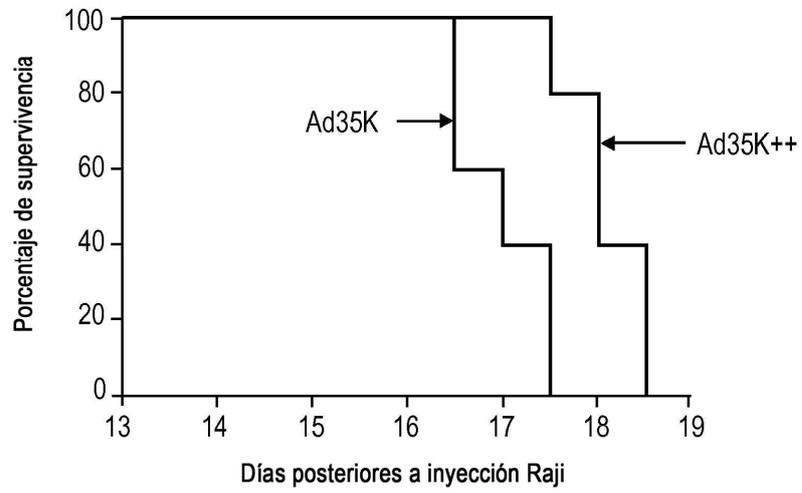
**FIG. 8A**



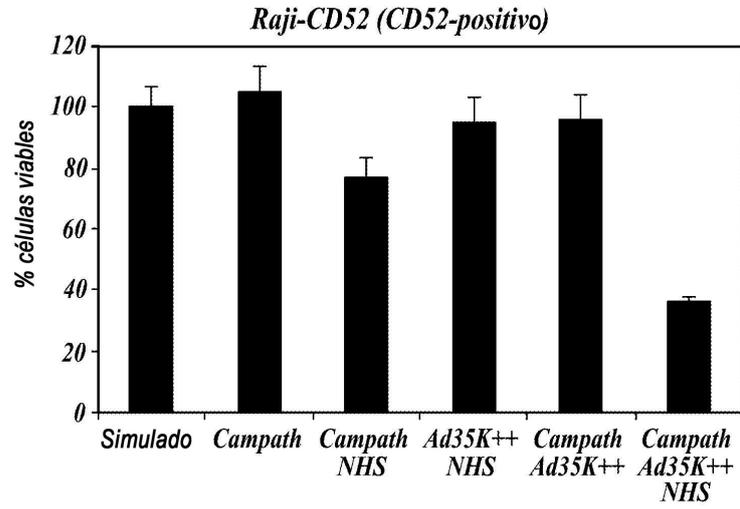
**FIG. 8B**



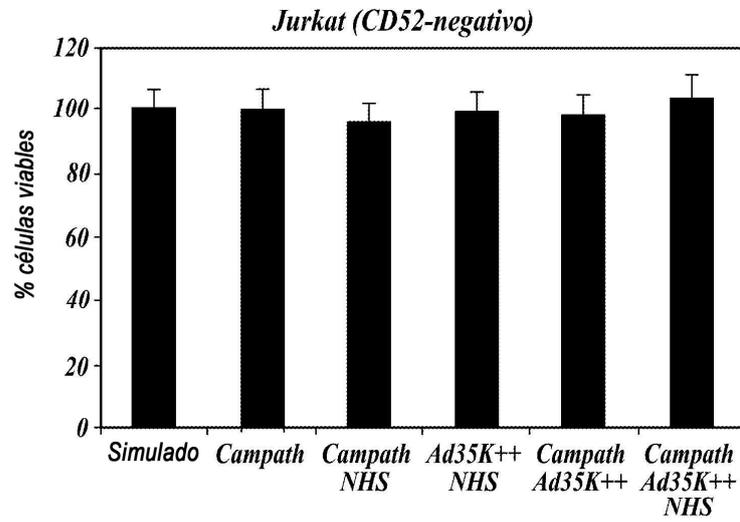
**FIG. 8C**



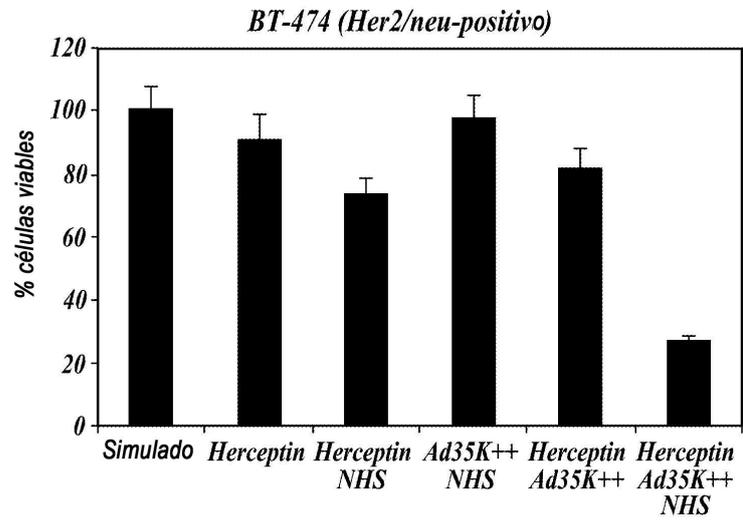
**FIG. 8D**



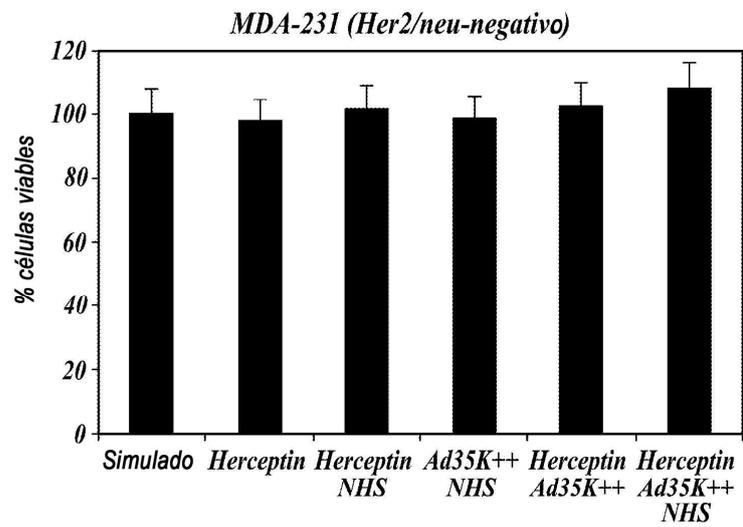
**FIG. 9A**



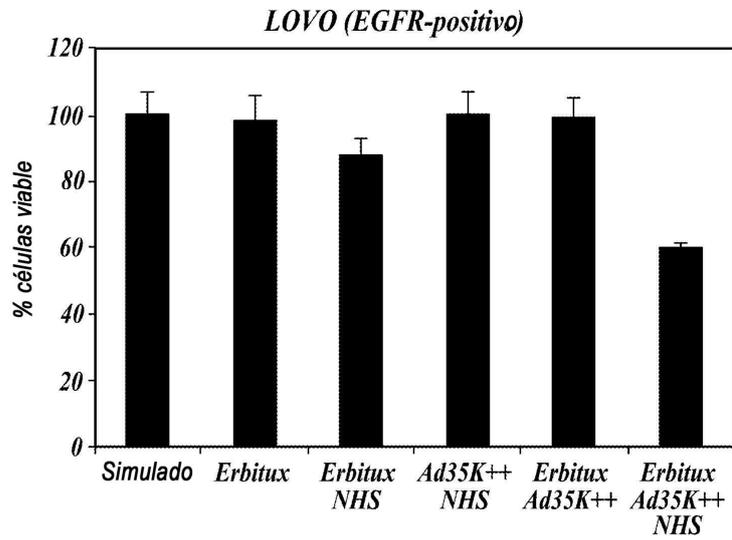
**FIG. 9B**



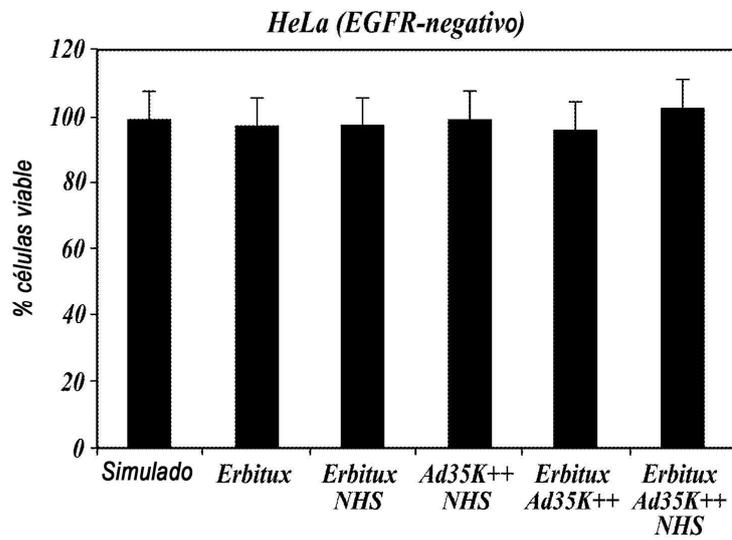
**FIG. 10A**



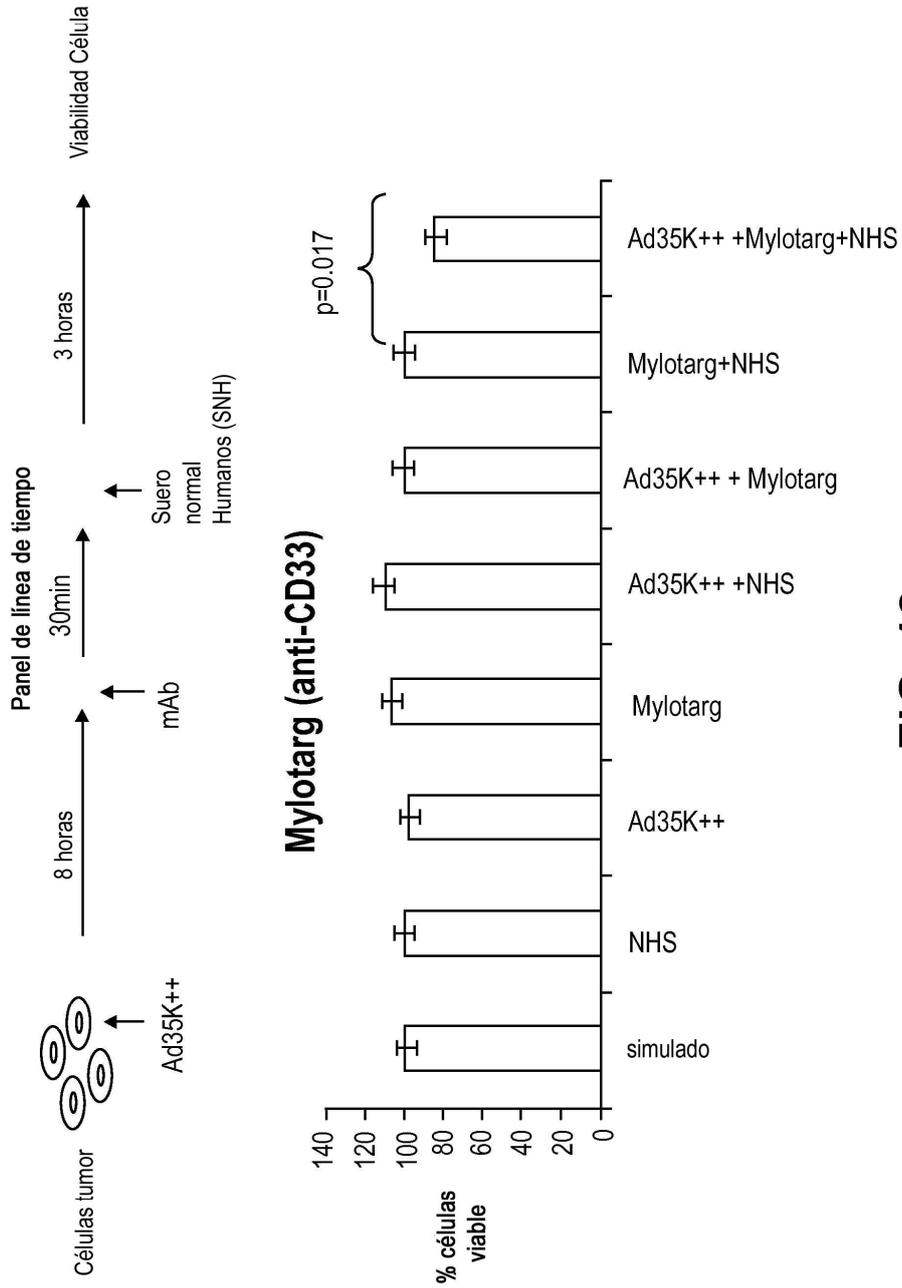
**FIG. 10B**



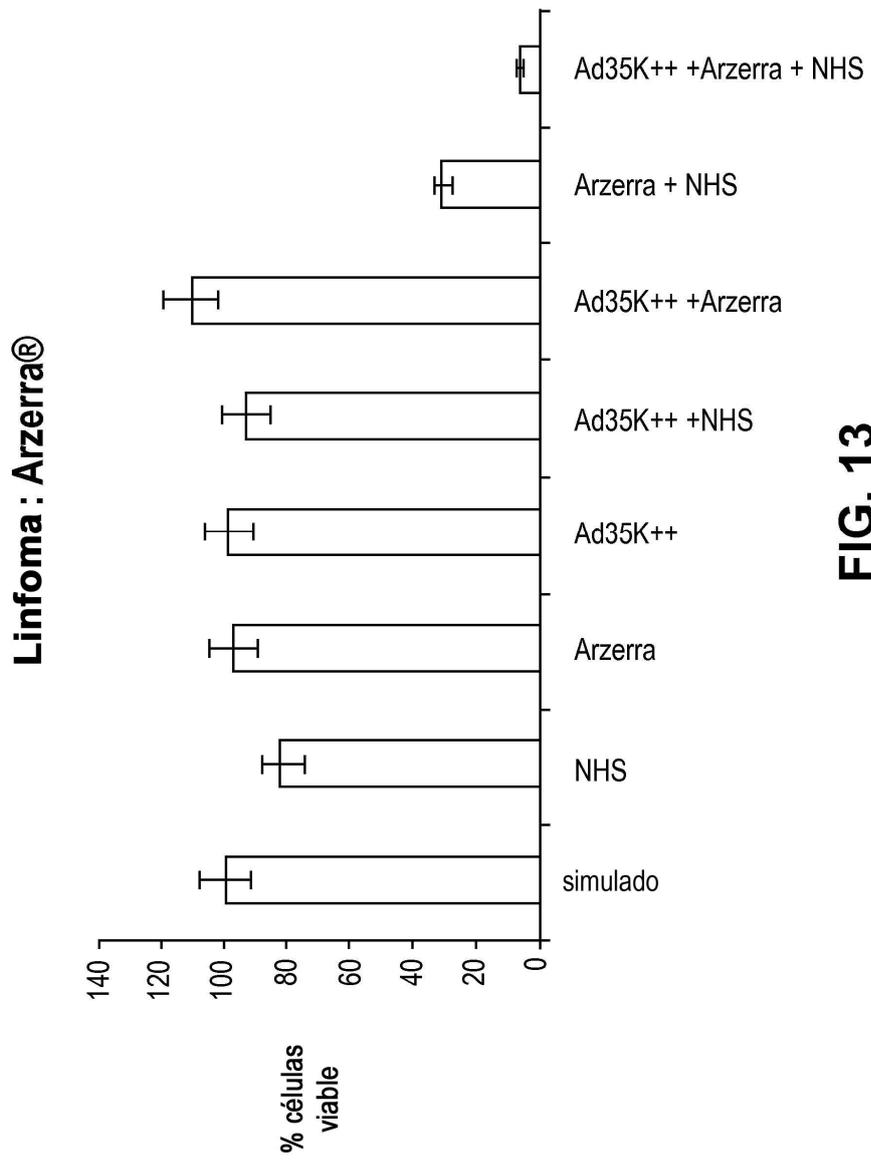
**FIG. 11A**



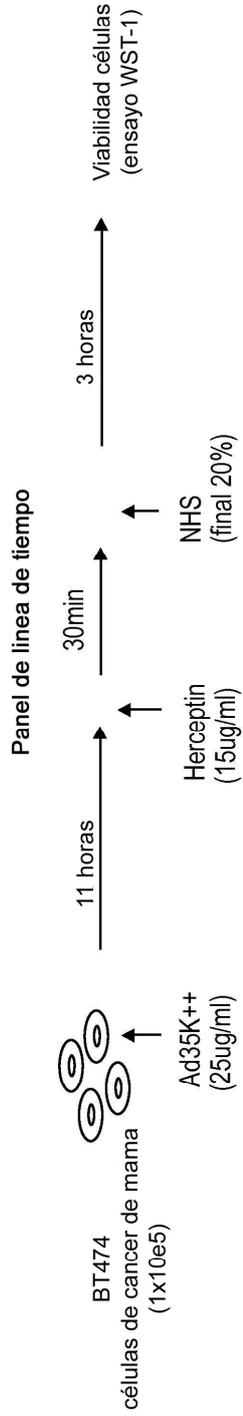
**FIG. 11B**



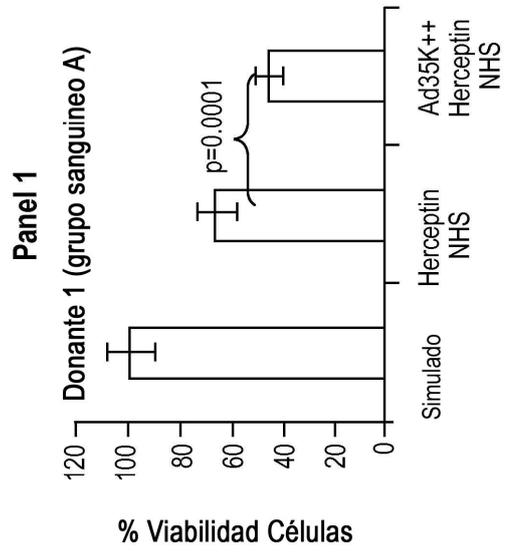
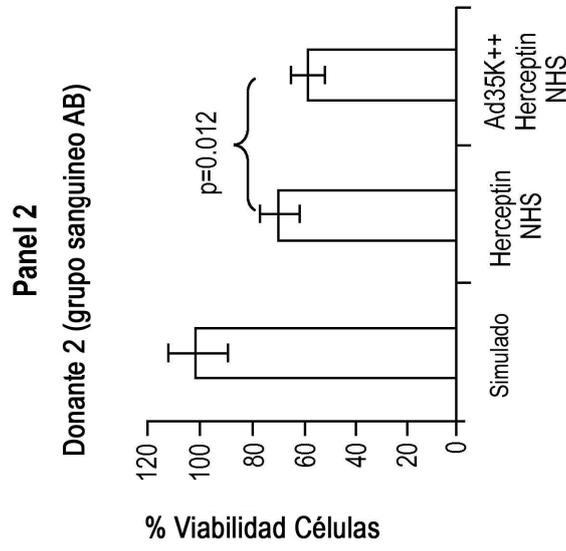
**FIG. 12**



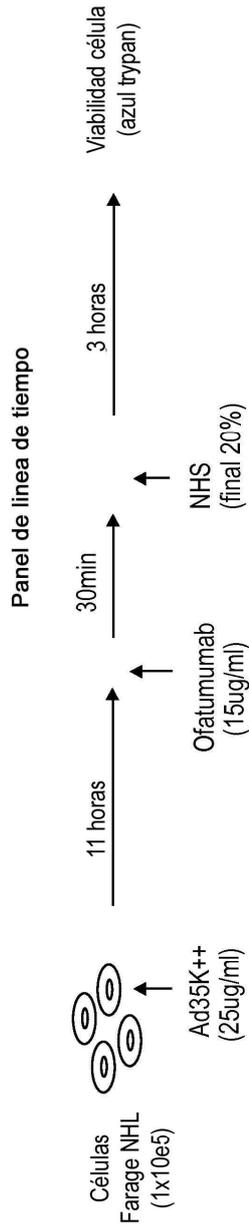
**FIG. 13**



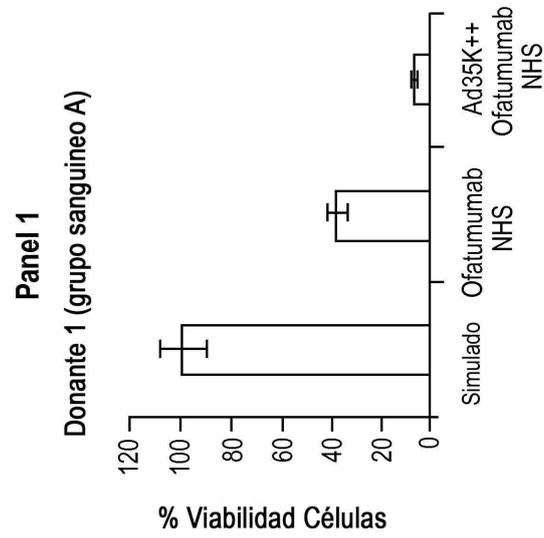
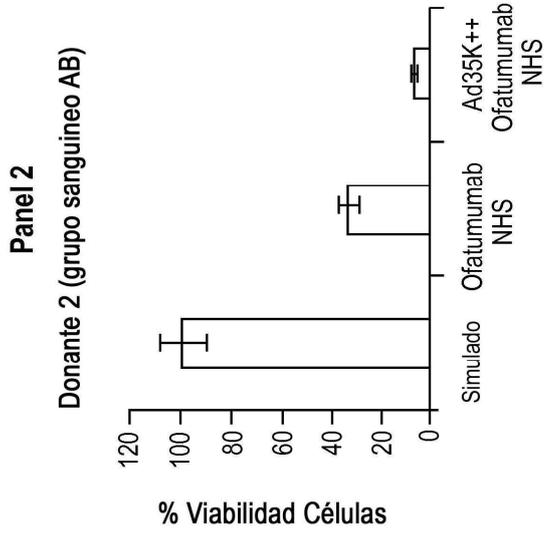
**FIG. 14A**



**FIG. 14B**



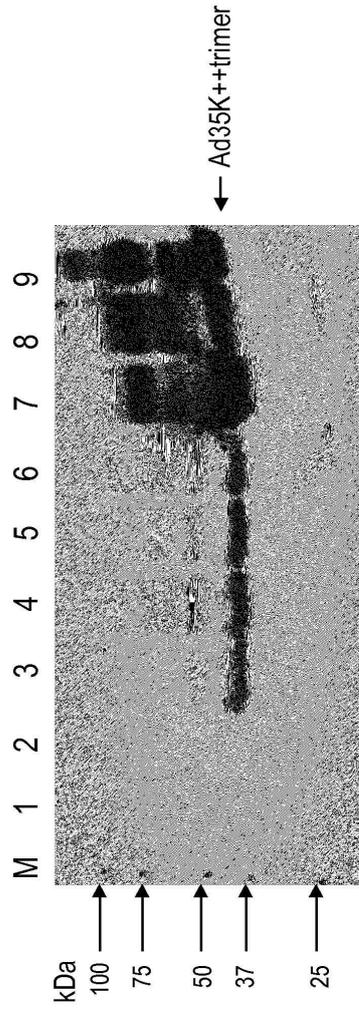
**FIG. 14C**



**FIG. 14D**

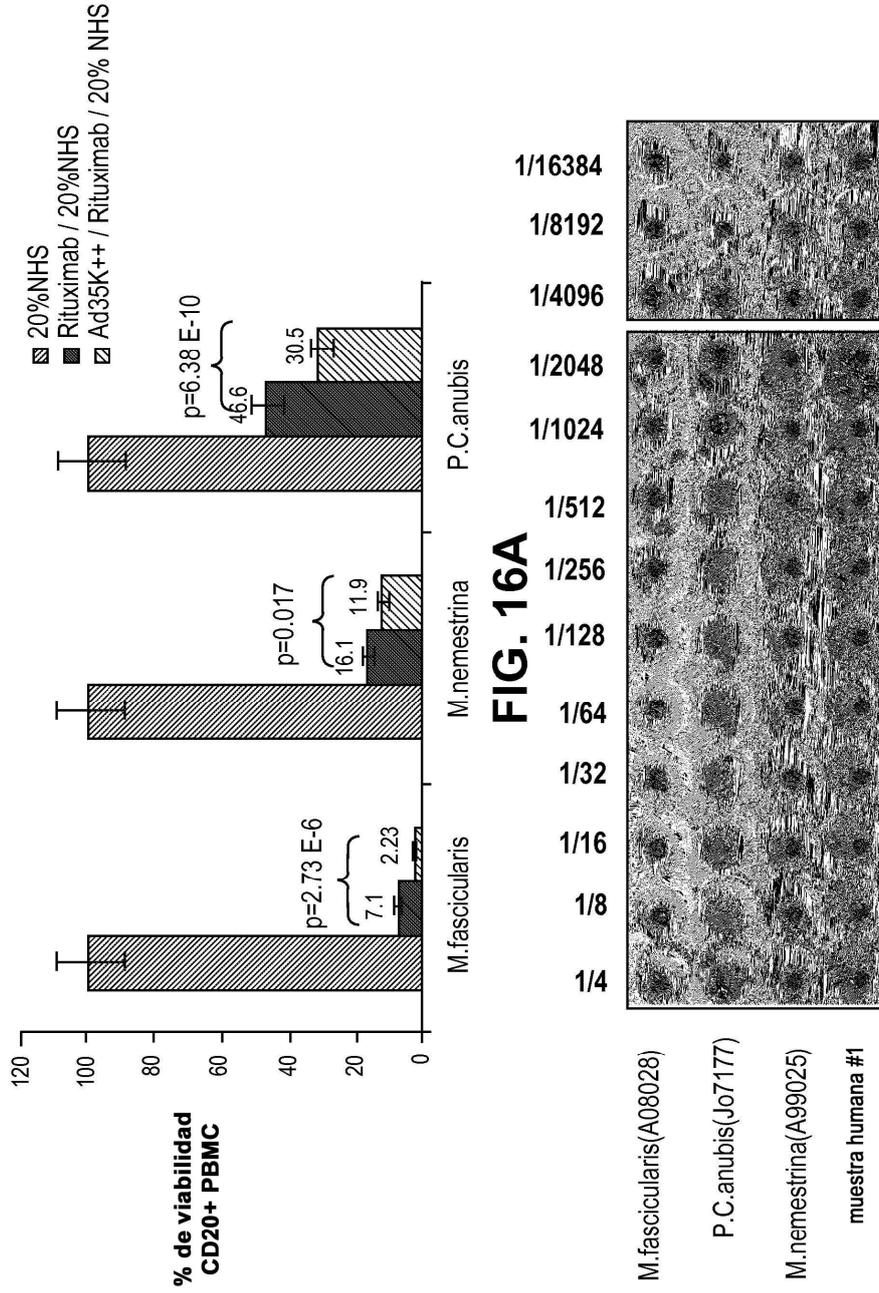


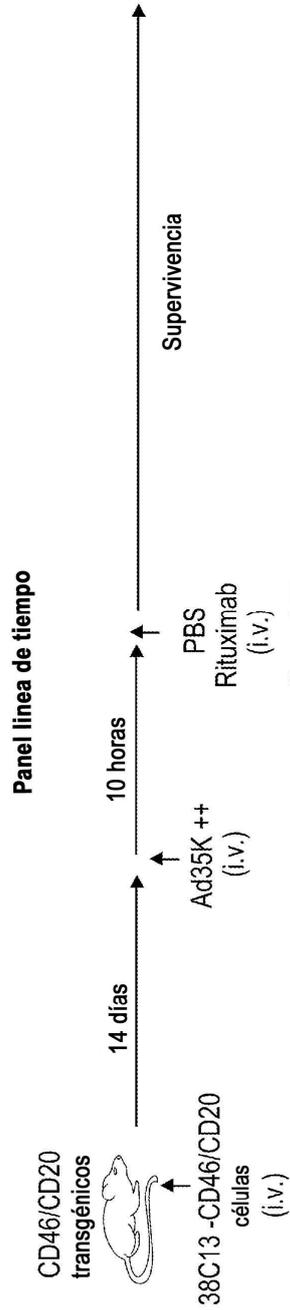




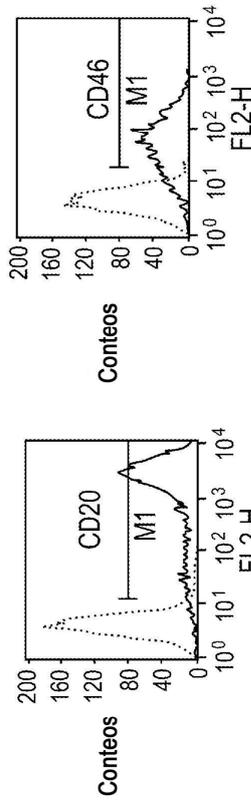
Carriles 1, 2: pET29a-Ad35K++ no inducido  
 Carriles 3, 4, 5, 6: pET29a-Ad35K++ inducido con 1mM IPTG (diferentes colonias)  
 Carril 7: pQE30-Ad35K++ no inducido (su etiquetado)  
 Carril 8: pQE30-Ad35K++ inducido con 1mM IPTG  
 Carril 9: Ad35k++ purificado (~2 ug/carril) (su etiquetado)

**FIG. 15D**





**FIG. 17A**

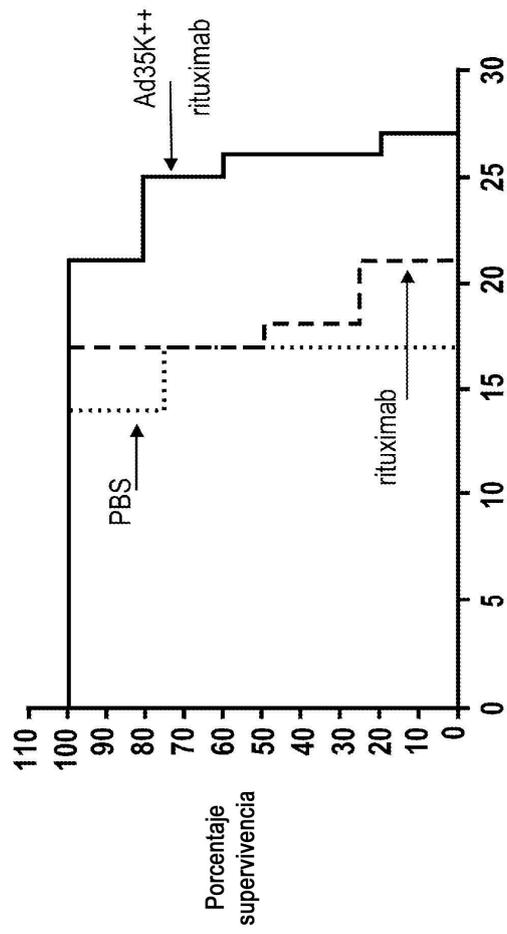


**PANEL B**

**PANEL A**

**FIG. 17C**

**FIG. 17B**



**FIG. 17D**