

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 320**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.09.2014** **PCT/US2014/057139**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2015** **WO15048081**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2014** **E 14783729 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017** **EP 3049520**

54 Título: **Proteínas de unión a desmogleina 2 (DSG2) y sus usos**

30 Prioridad:

24.09.2013 WO PCT/US2013/061431
18.03.2014 US 201461954822 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
19.10.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF WASHINGTON THROUGH ITS
CENTER FOR COMMERCIALIZATION (100.0%)
4311 11th Avenue NE Suite 500
Seattle, WA 98105, US**

72 Inventor/es:

**LIEBER, ANDRE y
WANG, HONGJIE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 638 320 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).

DESCRIPCIÓN

Proteínas de unión a desmogleína 2 (DSG2) y sus usos

Declaración de derechos del gobierno

Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno de EE. UU. bajo R01 CA80192 y R01 HLA078836 otorgado por los Institutos Nacionales de la Salud. El gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos en esta invención.

Antecedentes

Los adenovirus humanos (Ads) se han clasificado en seis especies (A a F), que actualmente contienen 51 serotipos. La mayoría de los serotipos de Ad utilizan el receptor del adenovirus coxsackie (CAR) como receptor primario de fijación (Bergelson y colaboradores, 1997). Este no es, sin embargo, el caso para los serotipos de Ad de la especie B. Recientemente, los inventores han sugerido un nuevo grupo de Ads de la especie B basado en su uso de receptores (Tuve y colaboradores, 2006). El Grupo 1 (Ad16, 21, 35, 50) utiliza casi exclusivamente CD46 como receptor; el Grupo 2 (Ad3, Ad7, 14) comparte uno o más receptores comunes no identificados, que no son CD46 y que se denominaron provisionalmente receptor X; el Grupo 3 (Ad11) interactúa preferentemente con CD46, pero también utiliza el receptor X si CD46 está bloqueado.

Los Ads de la especie B son patógenos humanos comunes. Desde 2005, se observó una aparición simultánea de diversos serotipos de la especie B en la mayoría de las instalaciones de entrenamiento militar de los Estados Unidos. Esto incluyó serotipos Ad3, Ad7, y Ad14 (Metzgar y colaboradores, 2007). En 2007, se descubrió una nueva cepa altamente patógena y posiblemente una cepa más virulenta de Ad14, Ad14a, en varios sitios de los Estados Unidos y en Asia (Louie y colaboradores, 2008; Tate y colaboradores, 2009). Recientemente los inventores han demostrado que Ad14a pertenece a los Ads del grupo 2 de la especie B con respecto a su uso de receptores (Wang y colaboradores, 2009). Colectivamente, todos los serotipos (Ad3, Ad7, Ad14, Ad14a, Ad11) que utilizan receptores X se denominan aquí como AdB-2/3.

AdB-2/3 tienen gran relevancia como vectores de transferencia de genes, particularmente con respecto a tumores de origen epitelial, que representan la mayoría de tumores sólidos (Yamamoto y Curiel, 2010). Las células epiteliales mantienen varias uniones intercelulares y una polaridad apical-basal. Las características clave de las células epiteliales se conservan en los cánceres epiteliales *in situ* y en líneas celulares del cáncer (Turley y colaboradores, 2008). Tanto CAR como CD46 están atrapados a menudo en las uniones estrechas y de adherencia de células cancerosas epiteliales y no son accesibles a los Ads que utilizan estos receptores de unión (Coyne y Bergelson, 2005; Strauss y colaboradores, 2009). Por el contrario, AdB-2/3 infecta eficientemente las células cancerosas epiteliales, que se realiza en parte mediante la inducción de procesos que recuerdan a la transición Epitelial-Mesenquimal (EMT) (Strauss y colaboradores, 2009). Otra característica distintiva de AdB-2/3 es su capacidad para producir partículas dodecaédricas subvirales durante su replicación, que consiste en una fibra Ad y base de pentón (Norrby y colaboradores, 1967). El pentón-dodecaédrico (PtDd) no puede ensamblarse a partir de la proteína de base de pentón de longitud completa, pero requiere un truncamiento N-terminal espontáneo por proteólisis entre los restos 37 y 38 (Fuschiotti y colaboradores, 2006). Este sitio escindido se conserva en Ad3, Ad7, Ad11, y Ad14 pero no está presente en Ad2 y Ad5. En el caso de Ad3 el PtDd se forma a un exceso masivo de $5,5 \times 10^6$ PtDd por virus infeccioso (Fender y colaboradores, 2005), y se ha sugerido que el PtDd aumenta la infectividad de Ad3 por perturbación de las uniones intercelulares, favoreciendo así la propagación del virus (Walters y colaboradores, 2002).

Compendio de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de fibra AdB-2/3 recombinante, que comprende: (a) uno o más motivos de dominio de eje del polipéptido de fibra AdB-2/3; (b) un dominio de protuberancia del polipéptido de fibra AdB-2/3 operativamente unido y localizado en C-terminal a uno o más motivos de dominio de eje de polipéptido de fibra AdB-2/3, en donde el dominio de protuberancia del polipéptido de fibra AdB-2/3 comprende el péptido de uno cualquiera de SEC ID NOS: 1-11, en donde cuando el dominio de protuberancia del polipéptido de fibra AdB-2/3 comprende el péptido de uno cualquiera de SEC ID NOS: 1-4, al menos uno de los siguientes es cierto: X2 es P; X3 es E; X4 es S, o L; X5 es D; X6 es G; X7 es F; X8 es E; o X9 es S; y (c) uno o más dominios de dimerización no derivados de AdB-2/3 operativamente unido y localizado en C-terminal a uno o más motivos de dominio de eje de polipéptido de fibra AdB-2/3.

En una realización, el polipéptido de fibra AdB-2/3 no incluye un dominio de cola de polipéptido de fibra AdB-2/3. En otra realización, cada dominio de eje o motivos de dominio de eje se seleccionan del grupo que consiste en un dominio de eje o motivo de dominio de eje de polipéptido de fibra Ad3, un dominio de eje o motivo de dominio de eje de polipéptido de fibra Ad7, un dominio de eje o motivo de dominio de eje de polipéptido de fibra Ad11, un dominio de eje o motivo de dominio de eje de polipéptido de fibra Ad14, un dominio de eje de polipéptido de fibra Ad14a, o combinaciones de motivo de dominio de eje de los mismos, y equivalentes funcionales de los mismos. En una realización adicional, cada dominio de eje o motivo de dominio de eje comprende la secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de SEC ID NOS: 12-18, SEC ID NOS: 43-48, o combinaciones de los mismos. En otra realización, el dominio de dimerización comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID

NO: 24 y SEC ID NO: 25. En una realización adicional, el polipéptido de fibra AdB-2/3 recombinante comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEC ID NOS: 28-34. En otra realización, el polipéptido de fibra AdB-2/3 es multimerizado, tal como dimerizado. En una realización adicional, el polipéptido de fibra AdB-2/3 comprende además uno o más compuestos conjugados con el polipéptido de fibra AdB-2/3 recombinante, tal como agentes terapéuticos, de diagnóstico y de formación de imágenes.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican el péptido aislado o los polipéptidos de fibra AdB-2/3 recombinante de la invención, vectores de expresión recombinantes que comprenden los ácidos nucleicos aislados, y células huésped que comprenden los vectores de expresión recombinantes.

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas, que comprenden:

el multímero de fibra AdB-2/3 de cualquier realización o combinación de realizaciones de la invención; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona métodos para mejorar el tratamiento terapéutico, o el diagnóstico de un trastorno asociado con el tejido epitelial, y/o formación de imágenes de tejidos epiteliales, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite:

una cantidad de uno o más agentes terapéuticos suficiente para tratar el trastorno, agente de diagnóstico suficiente para diagnosticar el trastorno, y/o agente de formación de imagen suficiente para crear una imagen del tejido epitelial; y

una cantidad de un multímero de fibra AdB-2/3 o composición farmacéutica de cualquier realización o combinación de realizaciones de la invención, suficiente para mejorar la eficacia de uno o más de los agentes terapéuticos, de diagnóstico y/o de formación de imágenes.

Ejemplos de tales trastornos asociados con el tejido epitelial incluyen tumores sólidos, síndrome del intestino irritable, trastorno inflamatorio intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, estreñimiento, enfermedad de reflujo gastroesofágico, esófago de Barrett, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, bronquitis, enfisema pulmonar, fibrosis quística, enfermedad pulmonar intersticial, neumonía, hipertensión pulmonar primaria, embolia pulmonar, sarcoidosis pulmonar, tuberculosis, pancreatitis, trastornos del conducto pancreático, obstrucción del conducto biliar, colecistitis, coledocolitiasis, trastorno cerebral, psoriasis, dermatitis, glomerulonefritis, hepatitis, diabetes, trastornos del tiroides, celulitis, infección, pielonefritis, y cálculos biliares.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar un trastorno asociado con el tejido epitelial, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad de un multímero de fibra AdB-2/3 o una composición farmacéutica de cualquier realización o combinación de realizaciones de la invención, suficiente para tratar el trastorno. En realizaciones ejemplares, tal trastorno puede ser una infección viral o un tumor sólido.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona métodos para mejorar el suministro de un compuesto a un tejido epitelial, que comprende poner en contacto el tejido epitelial con uno o más compuestos para administrarse al tejido epitelial; y una cantidad del multímero de fibra AdB-2/3 o composición farmacéutica de cualquier realización o combinación de realizaciones de la invención, suficiente para mejorar el suministro de uno o más compuestos al tejido epitelial. En realizaciones ejemplares, uno o más compuestos pueden ser agentes de diagnóstico o de formación de imágenes.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona métodos para mejorar el suministro de una sustancia a un tejido que expresa desmogleína 2 (DSG2), que comprende poner en contacto el tejido que expresa DSG2 con

uno o más compuestos para ser suministrado al tejido; y

una cantidad de un multímero de fibra AdB-2/3 o composición farmacéutica de cualquier realización o combinación de realizaciones de la invención, suficiente para mejorar el suministro de uno o más compuestos al tejido.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para inducir una transición epitelial a mesenquimal (EMT) en un tejido, que comprende poner en contacto el tejido epitelial con una cantidad de multímero de fibra AdB-2/3 o composición farmacéutica de cualquier realización o combinación de realizaciones de la invención, suficiente para inducir EMT.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona métodos para identificar compuestos candidato para uno o más tratamientos de un trastorno asociado con tejido epitelial, mejorando el suministro de una sustancia a un tejido epitelial, para mejorar el suministro de tejido de la sustancia que expresa DSG2, inducir un EMT en un tejido, y/o tratar una infección por AdB-2/3 que comprende

poner en contacto un multímero de fibra AdB-2/3 de cualquier realización o combinación de realizaciones de la invención, a DSG2 bajo condiciones para promover la unión del multímero a DSG2, en donde el contacto se realiza en presencia de uno o más compuestos de ensayo; y

identificar compuestos de ensayo positivos que compiten con el multímero de fibra AdB-2/3 para la unión a DSG2 comparado con el control;

en donde los compuestos de ensayo positivos son compuestos candidatos para uno o más de los tratamientos de un trastorno asociado con el tejido epitelial, mejorando el suministro de una sustancia al tejido epitelial, para mejorar el suministro de un tejido de la sustancia que expresa DSG2, inducir un EMT en un tejido, y/o tratar una infección por AdB-2/3.

Descripción de las Figuras

Figura 1. Restos que se encuentra críticamente implicados en la unión a DSG2. A) Se muestran las secuencias de aminoácidos de la protuberancia de fibras Ad3 y Ad14p1. Las hojas beta presentes en la protuberancia Ad3 (número de entrada PDB 1H7Z_A) y protuberancia Ad14 (PDB: 3F0Y_A) se indican mediante líneas. Las flechas negras indican restos dentro de la protuberancia de fibra Ad3 que, cuando se mutan individualmente, producen ablación o reducen la unión a DSG2. Comparado con la cepa parental Ad14 (deWit), Ad14p1 tenía una delección de dos restos de aminoácidos dentro del bucle FG de la protuberancia de la proteína de fibra (24) indicado por un triángulo. B) Estructura esquemática de los mutantes de la protuberancia de fibra Ad3 diméricos. El dominio de la protuberancia de fibra y un motivo de eje se unieron mediante un conector flexible a un dominio de bobina K homodimerizable (41). Las proteínas son auto-dimerizantes y se pueden purificar por cromatografía de afinidad His-Ni-NTA. C-F) Análisis de unión de los mutantes de la protuberancia de fibra Ad3 diméricos a DSG2 soluble. C y D) Tinción Coomassie. Se cargaron 10 µg de la protuberancia de fibra Ad3 purificada (sin hervir) por carril. Las formas triméricas de las protuberancias de fibra se indican mediante una flecha. El gel contenía SDS y el tampón de carga que contiene DTT, que provocó el desmontaje de los dímeros de las protuberancias de fibra triméricas como se informó previamente (41). E y F): Transferencia de Western utilizando DSG2 recombinante soluble como sonda, seguido por mAb anti-DSG2 y HRP IgG anti-ratón. Para comparación, se muestra JO-1 (0,5 µg/carril). Se analizaron las transferencias de Western y se cuantificaron las señales.

Figura 2. Modelo 3D de la protuberancia de fibra Ad3. La estructura se basa en el número de acceso PDB 1H7Z_A. Panel superior: cuatro áreas críticas involucradas en la unión a DSG2. Los restos críticos se muestran en la isosuperficie de la protuberancia de fibra trimérica. Vista desde la parte superior (lado apical) frente al receptor. Panel inferior: Todos los restos críticos combinados. Lado derecho: Una ampliación del surco después de una ligera rotación lateral.

Figura 3. Competencia del virus Ad3 por los mutantes de la protuberancia Ad3 dimerizados. A) Unión relativa del virus Ad3 marcado en ^3H en presencia de los mutantes de la protuberancia de fibra diméricos. Se incubaron células HeLa $1,8 \times 10^5$ con mutantes de la protuberancia Ad3 a una concentración de 2,5 y 100 µg/ml en hielo durante 1 hora. Después se añadieron 400 pfu/célula de virus ^3H -Ad3 en hielo durante otra hora. Partículas de virus no unidas se eliminaron por lavados. La unión de partículas de virus incubadas con PBS se tomó como 100%. N=3. B) Competencia de la infección por virus Ad3-GFP en células HeLa. Se sembraron $1,5 \times 10^5$ células HeLa en placas de 24 pocillos. Las células se incubaron con mutantes de la protuberancia Ad3 a concentraciones crecientes durante una hora a temperatura ambiente. Después se añadieron 100 pfu/célula de virus Ad3-GFP y la expresión de GFP se analizó 18 horas después mediante citometría de flujo. Panel izquierdo: porcentaje de células GFP positivas. Panel derecho: intensidad media de fluorescencia. N=3. La desviación estándar fue inferior al 10%. C) Unión relativa del virus Ad3 marcado en ^3H en presencia de mutantes de la protuberancia de fibra diméricos con mutaciones múltiples. El estudio se realizó como se describe en B). La desviación estándar fue inferior al 10%. D) Competencia de la infección por virus Ad3-GFP en células HeLa. El estudio se realizó como se describe en C). La desviación estándar fue inferior al 10%.

Figura 4. Análisis de la unión de la protuberancia de fibra Ad3 a CD46 soluble. Las protuberancias de fibras Ad3 que contiene diferentes números de motivos de eje y la protuberancia de fibra Ad3 de tipo nativo (carril 1: Ad3-S6/Kn, carril 2: Ad3-S5/kn, carril 3: Ad3-S4/kn, carril 4: Ad3-S3/kn, carril 5: Ad3-S2/kn, carril 6: Ad3-S/kn), JO-1 (carril 7) y unión de la protuberancia de fibra Ad35 a CD46 (carril 8) se borraron e hibridaron con DSG2 soluble (panel superior) o CD46 soluble (panel inferior). La unión se detectó mediante mAb anti-DSG2 o mAb anti-CD46.

Figura 5. Correlación de la unión reducida a DSG2 con la capacidad para abrir las uniones epiteliales. A) Resistencia eléctrica transepitelial (TEER) medida en células T84 polarizadas de cáncer de colon. Las células se cultivaron en cámaras transwell hasta que la TEER fue constante, es decir, se habían formado uniones estrechas. Un total de 5 µg de protuberancias de fibras Ad3 diméricas en PBS se añadieron después durante 1 hora a la cámara apical. La TEER se midió en los puntos de tiempo indicados. N=6. Para los puntos de tiempo de 1,5 y 4 horas la diferencia entre JO-1 frente a D261N y N186D fue significativa ($p < 0,01$). Las flechas indican la adición y eliminación de las protuberancias de fibras Ad3. B) Mejora de la terapia con irinotecan. Un total de 4×10^6 células A549 se inyectaron por vía subcutánea en ratones CB17-SCID beige. Una vez que el tumor alcanzó un volumen de ~100 mm³ (día 15 después de la implantación), los ratones se inyectaron por vía intravenosa con 2 mg/kg de JO-1, E299V, N186D, o PBS, seguido por una inyección intravenosa de irinotecan (37,5 mg/kg) una hora después. El tratamiento se repitió al día 25. N=5. Las diferencias entre los grupos "irinotecan" frente a "E299V+irinotecan" o "irinotecan" frente a "N186+irinotecan" no fueron significantes. La diferencia entre "irinotecan" frente a JO-1+irinotecan fue significativa ($p < 0,01$) a partir del día 20 en adelante.

Figura 6. Sustituciones de aminoácidos que aumentan la unión a DSG2. A) Se muestra la secuencia de aminoácidos de las protuberancias de fibras Ad3. Las hojas beta se indican por líneas. Las flechas indican restos dentro de las protuberancias de fibras Ad3 que, cuando se mutan, producen señales más fuertes en ensayos de transferencias de colonias, lo que indica una unión más fuerte a DSG2. B) La isosuperficie de los tres monómeros de la protuberancia. Panel izquierdo: Vista superior; Panel derecho: Vista lateral. V239 y Y250 no se exponen en la parte superior lo que sugiere un cambio estructural en la protuberancia en lugar de una participación en la unión directa a DSG2. C) Localización de todas las mutaciones que mejoran la unión a DSG2. Los restos se muestran en magenta en dos monómeros de la protuberancia. La isosuperficie de un monómero se muestra en transparencia gris.

Figura 7. Análisis SPR de las interacciones de las protuberancias de fibras Ad3 no-dimerizada con DSG2. A) DSG2 se inmovilizaron en chips de sensor, y el historial se sustrajo automáticamente de la celda de flujo de control. Las protuberancias de fibras Ad3 (dominio de dimerización w/o: "noDD") se inyectaron durante 3 minutos a 2,5 µg/ml seguido por un periodo de disociación de 2,5 minutos. B) Resumen de los datos de SPR. Un intervalo de concentración de 2,5 a 10 µg/ml de las protuberancias se ha inyectado y los parámetros cinéticos y de afinidad se han evaluado utilizando un software BIAeval. Los datos extraídos se resumen en la tabla. Wt= protuberancias de fibras Ad3 sin mutaciones.

Figura 8. Microscopía electrónica y estructura 3D del mutante JO-2 de la protuberancia de fibra Ad3. A-C) Tinción negativa de JO-2 con SST. Las formas diméricas se pueden ver pero organizaciones superiores también son visibles, un complejo heterogéneo de alrededor de 50 nm representado por flechas finas y partículas más pequeñas regulares "como-dodecaédricas" representadas por flechas gruesas. Las vistas de cerca se presentan en B y C. D - G) Estructura cristalográfica de la forma no-dimerizada del mutante K217E/F224S. D) Cristales de proteínas. E) Protuberancias Ad3 de tipo nativo se colorean en gris con el bucle EF 217-224 coloreado por separado. Este es el bucle que se desordena en el mutante. No hay densidad para estos restos en la estructura mutante. F) El mutante se muestra como un dibujo animado. G) La superposición de estas dos estructuras muestra que el bucle EG está completamente desordenado en el mutante K217E/F224S. Los paneles inferiores muestran vistas cercanas de un monómero, K217 y F224 aparecen como barras.

Figura 9. Análisis de los mutantes de la protuberancia de fibra Ad3 con mayor afinidad a DSG2. A) Competencia de la infección por el virus Ad3-GFP en células HeLa con el mutante Y250F y JO-1 con afinidad dimérica mejorada (protuberancia de fibra wt Ad3 dimérica). El ajuste experimental es como se describe en la Fig. 3C. Panel izquierdo: Porcentaje de células GFP positivas. Panel derecho: intensidad media de fluorescencia. N=3. La desviación estándar fue inferior al 10%. B) La competencia de la infección por el virus Ad3-GFP en células HeLa por mutantes de la protuberancia Ad3 con unión a DSG2 mejorada pero sin dominio de dimerización. Se sembraron $1,5 \times 10^5$ células HeLa en placas de 24 pocillos. Las células se incubaron con mutantes de la protuberancia Ad3 a las concentraciones crecientes durante una hora a temperatura ambiente. 100 pfu/célula de virus Ad3GFP se añadieron después y la expresión de GFP se analizó 18 horas después. C) TEER en células T84 de cáncer de colon. El ajuste experimental fue el mismo que para la Fig. 5A. Se muestra la TEER a 4 horas. N=3.

Figura 10. Combinación de versiones de JO-1 con afinidad mejorada con quimioterapia. A) Mejora de la terapia con irinotecan (I). El ajuste experimental fue el mismo como en la Fig. 5B. Las diferencias en los grupos "JO-1+1" frente a "JO-2+irinotecan" y "JO-2+1" frente a "JO-4+1" fueron significantes desde el día 20 en adelante. N=5. B) JO-4 mejora la terapia con PLD en un modelo de cáncer de ovario a dosis más bajas que JO-1. Se establecieron tumores de la almohadilla de grasa mamaria a partir de células ove316 de cáncer de ovario primario. El tratamiento empezó cuando los tumores alcanzaron un volumen de 100 mm³. Los ratones se inyectaron por vía intravenosa con 2 mg/kg de JO-1 o con 0,5 mg/kg de JO-4, seguido por una inyección intravenosa de doxorubicina liposomal PEGilada (PLD) (1 mg/kg) una hora después. El tratamiento se repitió semanalmente. C) JO-4 mejora la terapia en cáncer de mama triple negativo de mal pronóstico (TNBC). Un total de 4×10^6 células TNBC MDA-MB-231 se inyectaron en la almohadilla de grasa mamaria de ratones CB17SCID beige. JO-4 (2 mg/kg) se inyectaron vía intravenosa 1 hora antes de la aplicación de cetuximab (C) (10 mg/kg, i.p.) y nab-paclitaxel (nab-P) (5 mg/kg, i.v.). El tratamiento se dio semanalmente. N=10 P<0,01 al día 25 para nab-P+C frente a JO-4+nab-P+C.

Figura 11. Farmacocinéticas, toxicidad, e inmunogenicidad de JO-4. A) Liberación del suero de JO-1 y JO-4. Ratones transgénicos hDSG2 con tumores TC1-hDSG2 subcutáneos (600 mm³) fueron inyectados vía intravenosa con JO-1 o JO-4 (2 mg/kg) y muestras de suero se analizaron mediante ELISA. N=3. Tenga en cuenta que el eje y tiene una escala logarítmica. B) Recuento de linfocitos y plaquetas en ratones transgénicos hDSG2/TC1-hDSG2 después de la inyección de JO-1 o JO-4. N=3. C) Estudios de terapia en ratones transgénicos hDSG2 inmunocompetentes con tumores TC1-hDSG2. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de ~80 mm³, se inyectó JO-1 o JO-4 (2 mg/kg) o PBS por vía intravenosa seguido una hora después por PLD/Doxil (i.v. 1,5 mg/kg). El tratamiento se repitió tal como se indica mediante flechas. Los tumores se dejaron volver a crecer durante aproximadamente dos semanas. A partir del día 15 en anticuerpos del suero se detectaron anti-JO-1/J-4 por ELISA. Se realizaron dos ciclos más de tratamiento al día 28 y al día 35. JO-1 y JO-4 continuaron siendo efectivos después de múltiples ciclos de tratamiento, incluso en presencia de anticuerpos detectables. La diferencia entre JO-1/PLD frente a JO-4/PLD es significativa a partir del día 31 en adelante. N=10.

Figura 12. Alineamiento de las secuencias de protuberancia de fibras. Se indican los restos que producen ablación/reducen la unión de protuberancias Ad3 a DSG2.

Figura 13. Los sueros de humanos y ratones hipervacunados no inhiben la actividad de JO-4. A) Análisis del suero humano para la unión con JO-4 mediante ELISA. Se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo frente a protuberancias de fibras Ad3 para la captura, seguido por la proteína JO-1 recombinante, suero humano (diluciones 1:20 a 1:1000), y anti-IgG humano HRP. Suero humano Ab comercial empobrecido para IgG se utilizó como control negativo (línea horizontal). El suero de un científico que trabajaba rutinariamente con el virus Ad3 se utilizó como control positivo. P1 a P38 son muestras de suero para pacientes con cáncer de ovario obtenido a partir del Pacific Ovarian Cancer Research Consortium.

Descripción detallada de la invención

Dentro de esta solicitud, a menos que se indique lo contrario, las técnicas utilizadas se pueden encontrar en cualquiera de varias referencias bien conocidas tales como: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook, y colaboradores, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press), *Gene Expression Technology* (Methods in Enzymology, Vol. 185, editado por D. Goeddel, 1991. Academic Press, San Diego, CA), "Guide to Protein Purification" en *Methods in Enzymology* (M.P. Deutscher, ed., (1990) Academic Press, Inc.); *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis, y colaboradores, 1990. Academic Press, San Diego, CA), *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 2nd Ed. (R.I. Freshney, 1987. Liss, Inc. New York, NY), *Gene transfer and Expression Protocols*, pp. 109-128, ed. E.J. Murray, The Humana Press Inc., Clifton, N.J.), y the Ambion 1998 Catalog (Ambion, Austin, TX).

Como se usa aquí, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. "Y" como se usa aquí se utiliza indistintamente con "o" a menos que se indique expresamente lo contrario.

Como se usa aquí, los restos de aminoácidos se abrevian como sigue: 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).

Como se usa aquí, la abreviatura "Ad" se refiere a un adenovirus y está normalmente seguido por un número que indica el serotipo del adenovirus. Por ejemplo, "Ad3" se refiere al serotipo 3 del adenovirus.

Todas las realizaciones de cualquier aspecto de la invención se pueden utilizar en combinación, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos:

TLWTG(V/P)(N/K)P(---/T)(E/R)ANC(Q/I)(M/I)(M/E)(Y/A/N/D)(S/G)(S/K)(E/Q)(S/N)
(N/P)D(C/S)KL(I/T)L(I/T)LVK(T/N)G(A/G)(L/I)V(T/N)(A/G)(F/Y)V(Y/T)(V/L)(I/M)G(V/
A)
S(N/D)(N/D/Y)(F/V)N(M/T)L(T/F)(T/K)(Y/H/N)(R/K)N(I/V)(N/S)(F/I)(T/N)(A/V)EL(F/Y)
FD
(S/A)(A/T)G(N/H)(L/I)L(T/P)(S/R/D)(L/S)SSLKT(P/D)L(N/E) **X2**
X3(S/Y)(G/K)Q(N/T)(M/---)(A/---)(T/---)(G/---)A(I/L/D) **X4** (N/S)A(K/R)(S/G)FMPSTTAYPF
X5 (---/L)(N/P)(N/D/V)
(N/A)(S/G)(R/T)(E/H)(N/K/---) **X6** N **X7** I(Y/F)G(T/Q)C(H/Y)Y **X8**
ASD(H/G/R)(T/A)(A/L)FP
(I/L)(D/E)(I/V)(S/T)VMLN(Q/R/K)R(A/L)(I/L/P)(R/N/D)(A/D/N/S)(D/E/R)TSY(C/V)(I/M)
(R/T)(I/V/F)(T/L)WS(W/L) **X9** (T/A)G(D/L/V)APE(G/V/---)(Q/---)T(S/T)(A/Q)(T/A)TL(V/I)
TSPFTF(Y/S)YIREDD (SEQ ID NO: 1);

en donde

X2 es H, L, o P;

X3 es K o E;

X4 es T, F, S, o L;

X5 es V, D, o está ausente;

X6 es E, G, o está ausente;

X7 es Y o F;

X8 es T, K, o E; y

5 X9 es N o S;

en donde al menos uno de los siguientes es cierto:

X2 es P;

X3 es E;

X4 es S, o L;

10 X5 es D;

X6 es G;

X7 es F;

X8 es E; o

X9 es S.

15 Los polipéptidos aislados de acuerdo con este aspecto de la invención comprenden dominios de protuberancias de AdB-2/3 mutante, que se pueden utilizar, por ejemplo, para producir polipéptidos de fibra AdB-2/3 recombinantes que proporcionan afinidad significativamente mejorada para desmogleina 2 (DSG2) en comparación con polipéptidos anteriormente conocidos de unión a DSG2. Como se muestra en los ejemplos que siguen, los polipéptidos de fibra AdB-2/3 recombinantes de la invención que incorporan los dominios de protuberancia mutantes de este primer aspecto de la invención se muestra además que son terapéuticamente más potentes que los polipéptidos anteriormente conocidos de unión a DSG2 para el tratamiento de trastornos asociados al epitelio, ejemplificado por una eficacia mejorada en unas series de modelos de cáncer. Los péptidos aislados de la invención se pueden utilizar también, por ejemplo, como antígenos frente a virus AdB-2/3.

25 En una realización, los polipéptidos aislados del primer aspecto de la invención comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos

TLWTG(V/P)(N/K)P(E/R)ANC(Q/I)(M/I)(M/E)(Y/A/N/D)(S/G)(S/K)(E/Q)(S/N)(N/P)D
(C/S)KL(I/T)L(I/T)LVK(T/N)G(A/G)
(L/I)V(T/N)(A/G)(F/Y)V(Y/T)(V/L)(I/M)G(V/A)S(N/D)
(N/D/Y)(F/V)N(M/T)L(T/F)(T/K)(Y/H/N)(R/K)N(I/V)(N/S)(F/I)(T/N)(A/V)EL(F/Y)FD(S/A
)
(A/T)G(N/H)(L/I)L(T/P)(S/R/D)(L/S)SSLKT(P/D)L(N/E) X2
X3(S/Y)(G/K)Q(N/T)A(I/L/D)
X4 (N/S)A(K/R)(S/G)FMPSTTAYPF X5 (--/L)(N/P)(N/D/V)(N/A)(S/G)(R/T)(E/H)(N/K/--)
X6 N X7 I(Y/F)G(T/Q)C(H/Y)Y X8 ASD(H/G/R)(T/A)(A/L)FP(I/L)(D/E)(I/V)(S/T)VMLN
(Q/R/K)R(A/L)(I/L/P)(R/N/D)(A/D/N/S)(D/E/R)TSY(C/V)(I/M)(R/T)(I/V/F)(T/L)WS
(W/L) X9 (T/A)G(D/L/V)APET(S/T)(A/Q)(T/A)TL(V/I)TSPFTF(Y/S)YIREDD (SEQ ID
NO: 2).

En otra realización, los polipéptidos aislados del primer aspecto de la invención comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos

TLWTG(V/P)(N/K)P(E/R)ANC(Q/I)(M/I)(M/E)(Y/A/N/D)(S/G)(S/K)(E/Q)(S/N)(N/P)D
(C/S)KL(I/T)L(I/T)LVK(T/N)G(A/G)
(L/I)V(T/N)(A/G)(F/Y)V(Y/T)(V/L)(I/M)G(V/A)S(N/D)
(N/D/Y)(F/V)N(M/T)L(T/F)(T/K)(Y/H/N)(R/K)N(I/V)(N/S)(F/I)(T/N)(A/V)EL(F/Y)FD(S/A
)
(A/T)G(N/H)(L/I)L(T/P)(S/R/D)(L/S)SSLKT(P/D)L(N/E) X2
X3(S/Y)(G/K)Q(N/T)A(I/L/D)
X4 (N/S)A(K/R)(S/G)FMPSTTAYPF X5 L(N/P)(N/D/V)(N/A)(S/G)(R/T)(E/H)(N/K/) X6 N
X7 I(Y/F)G(T/Q)C(H/Y)Y X8 ASD(H/G/R)(T/A)(A/L)FP(I/L)(D/E)(I/V)(S/T)VMLN
(Q/R/K)R(A/L)(I/L/P)(R/N/D)(A/D/N/S)(D/E/R)TSY(C/V)(I/M)(R/T)(I/V/F)(T/L)WS
(W/L) X9 (T/A)G(D/L/V)APET(S/T)(A/Q)(T/A)TL(V/I)TSPFTF(Y/S)YIREDD (SEQ ID
NO: 3).

En una realización adicional, los polipéptidos aislados del primer aspecto de la invención comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos

TLWTGPKPEA NCIEYGKQN PDSKLTILV KNKG(I/L)VNGYV TLMGASDYVN
TLFKNKNVSI NVELYFDATG HILPDSSSLK TDLEX2 X3YKQT AD X4 SARGFMP
STTAYPFX5LP NAGTHNX6X7 I FGQCY X8 ASD GALFPLEVTV MLNKRLPDSR

- 5 TSYVMTFLWS LX9AGLAPETT QATLITSPFT FSYIREDD (SEQ ID NO: 4).

En todas estas realizaciones, al menos uno de los siguientes es cierto:

X2 es P;

X3 es E;

X4 es S, o L;

- 10 X5 es D;

X6 es G);

X7 es F;

X8 es E; o

X9 es S.

- 15 En varias realizaciones, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, o todas las 8 de estos enunciados son ciertos. En una realización ejemplar, al menos X7 es F. En otra realización, al menos X3 es E y X4 es S. En otra realización, al menos X9 es S. En una realización adicional, al menos X5 es D. En otra realización, al menos X4 es L. En otra realización, al menos X2 es P y X8 es E. En otra realización, al menos X6 es G y X8 es E.

En varias realizaciones adicionales, el polipéptido aislado comprende o consiste en uno de los siguientes péptidos:

- 20 (a) TLWTGPKPEANCIIEYGKQNPDSKLTILVKNGGIVNGYVTLMGASDYV NTLFKNKNVSINVELYFDATGHILPDS-
SSSKTDLELYKQTADFSARGFMPSTTAYPFVLP NAGTHNENIFGQCYKASDGALFPLEVTVMLNKRLPSRT-
SYVMTFLWSL NAGLA PETTQATLITSPFTFSYIREDD (SEC ID NO: 5);

- (b) TLWTGPKPEANCIIEYGKQNPDSKLTILVKNGGIVNGYVTLMGASDYVN TLFKNKNVSINVELYFDATGHILP-
DSSSLKTDLELYKQTADSSARGFMPSTTAYPFV LPNAGTHNENYIFGQCYKASDGALFPLEVTVMLNKRLPD-
25 SRTSYVMTFLWSL NAG LAPETTQATLITSPFTFSYIREDD (SEC ID NO: 6);

(c) TLWTGPKPEANCIIEYGKQNPDSKLTILVKNGGIVNGYVTLMGASDYVNTL FKNKNVSINVELYFDATGHILPD-
SSSKTDLELYKQTADFSARGFMPSTTAYPFVLP NAGTHNENYIFGQCYKASDGALF-PLEVTVMLNKRLPD-
SRTSYVMTFLWSL SAGLA PETTQATLITSPFTFSYIREDD (SEC ID NO: 7);

(d) TLWTGPKPEANCIIEYGKQNPDSKLTLLVKNNGGIVNGYVTLMGASDYVNTL FKNKNVSINVELYFDATGHILPDS-SSLKTDLEPKYKQTADFSARGFMPSTTAYPFDLP NAGTHNENYIFGQCYYKASDGALFPLEVTVMNLKRLPD-SRTSYVMTFLWSL NAGLA PETTQATLITSPFTFSYIREDD (SEC ID NO: 8);

5 (e) TLWTGPKPEANCIIEYGKQNPDSKLTLLVKNNGGLVNGYVTLMGASDYVN TLFKNKNVSINVELYFDAT-GHILPDS-SSLKTDLEPKYKQTADFSARGFMPSTTAYPFVL PNAGTHNENYIFGQCYYEASDGALF-PLEVTVMNLKRLPD-SRTSYVMTFLWSL NAGL APETTQATLITSPFTFSYIREDD (SEC ID NO: 9);

(f) TLWTGPKPEANCIIEYGKQNPDSKLTLLVKNNGGIVNGYVTLMGASDYV NTLFKNKNVSINVELYFDATGHILPDS-SSLKTDLEPKYKQTADLSARGFMPSTTAYPF VLPNAGTHNENYIFGQCYYKASDGALFPLEVTVMNLKRLPD-SRTSYVMTFLWSL NA GLAPETTQATLITSPFTFSYIREDD (SEC ID NO: 10); y

10 (g) TLWTGPKPEANCIIEYGKQNPDSKLTLLVKNNGGIVNGYVTLMGASDYV NTLFKNKNVSINVELYFDATGHILPDS-SSLKTDLEPKYKQTADFSARGFMPSTTAYPF VLPNAGTHNGNYIFGQCYYEASDGALFPLEVTVMNLKRLPD-SRTSYVMTFLWSL NA GLAPETTQATLITSPFTFSYIREDD (SEC ID NO: 11).

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de fibra AdB-2/3 recombinante, que comprende:

15 uno o más dominios de eje de polipéptido de fibra AdB-2/3, motivos de dominio de eje o equivalentes funcionales de los mismos;

20 un dominio de protuberancia de polipéptido de fibra AdB-2/3, unido operativamente a un C-terminal localizado al uno o más dominios de eje del polipéptido de fibra AdB-2/3 o motivos del dominio de eje, en donde el dominio de protuberancia de polipéptido de fibra AdB-2/3 comprende el polipéptido de cualquier realización o combinación de realizaciones del primer aspecto de la invención; y

uno o más dominios de dimerización no derivados de AdB-2/3 unidos operativamente a N-terminal y localizados a uno o más dominios de eje del polipéptido de fibra AdB-2/3 o motivos de dominio del eje.

25 Como se utiliza aquí, "AdB-2/3" es cualquier serotipo del adenovirus que utiliza DSG2 como un receptor de células epiteliales para unión viral. Hasta la fecha, se han identificado los serotipos Ad3, Ad7, Ad11, Ad14 y Ad14a. A medida que se identifican otros serotipos de Ad, aquellos expertos en la técnica pueden identificar rápidamente aquellos que pertenecen a la familia AdD-2/3 en base a los ensayos de unión a DSG2 como se describe aquí. Por ejemplo, los estudios de resonancia de plasmón superficial (SPR) que utilizan sensores que contienen DSG2 recombinante inmovilizado se pueden utilizar para determinar si los nuevos serotipos de Ad se unen a DSG2, combinado con los estudios de competición de DSG2. Estudios adicionales ejemplares, tales como análisis de la pérdida o ganancia de función, se describen en detalle en el documento de Patente WO 2011/156761.

30 El virión del adenovirus es un icosaedro caracterizado por una fibra situada en la base de cada uno de los 12 vértices de la cápside. La fibra en el virión es una estructura homotrimérica que consiste en 3 polipéptidos de fibra individuales. Cada polipéptido de fibra del adenovirus es una estructura asimétrica que consiste en una cola N-terminal, que interacciona con la proteína base del pentón de la cápside y contiene las señales necesarias para el transporte de la proteína al núcleo de la célula; un eje, que contiene un número de unidades de repetición de 15 restos; y un dominio de protuberancia C-terminal que contiene los determinantes para la unión al receptor (J.S. Hong y J.A. Engler, *Journal of Virology* 70:7071-7078 (1996)). Todos los adenovirus se unen a sus receptores a través de la estructura de protuberancia en el extremo de la fibra. Por lo tanto, tal como se usa aquí, el término "polipéptido de fibra" AdB-2/3 se refiere a un polipéptido de fibra de longitud completa que comprende un dominio de cola N-terminal, un dominio de eje o un motivo de dominio de eje, un dominio de protuberancia C-terminal. Los polipéptidos de fibra se unen espontáneamente en homotrimeros, denominados "fibras", que se sitúan en el exterior del virión del adenovirus en la base de cada uno de los doce vértices de la cápside.

35 En una realización preferida, los polipéptidos recombinantes no incluyen un dominio de cola de un polipéptido de fibra Ad. Como se describe en detalle a continuación, los inventores identificaron restos críticos, cuya mutación dio como resultado polipéptidos de fibra con afinidad para DSG2 significativamente mejorada, y con potencia terapéutica significativamente mejorada. Los polipéptidos de este aspecto de la invención se pueden utilizar por tanto, por ejemplo, para formar multímeros de fibras AdB-2/3 para uso en los diferentes métodos de la invención descritos anteriormente. En este aspecto, los polipéptidos recombinantes pueden incluir dominios de eje o motivos de dominio de eje de cualquier virus AdB-2/3, o cualquier mutante (sustituciones, adiciones, delecciones, quimeras, etc.) a tales dominios de eje o motivos de dominio de eje que retienen o mejoran la afinidad de unión a DSG2, y son capaces de formar multímeros (tales como dímeros) vía el dominio de dimerización (equivalentes funcionales). Por ejemplo, pueden utilizarse estudios de resonancia de plasmón superficial (SPR) usando sensores que contienen DSG2 recombinante inmovilizado para determinar si los polipéptidos recombinantes que se están evaluando se unen a DSG2, combinado con estudios de competición de DSG2.

55 Como se usa en toda la presente solicitud, el término "polipéptido" se utiliza en su sentido más amplio para referirse a una secuencia de subunidades de aminoácidos. Los polipéptidos de la invención pueden comprender L-aminoácidos, D-aminoácidos (que son resistentes a proteasas específicas de L-aminoácidos in vivo), o una

combinación de D- y L-aminoácidos. Los polipéptidos descritos aquí se pueden sintetizar químicamente o expresar de forma recombinante. Los polipéptidos se pueden unir a otros compuestos para promover una semivida aumentada *in vivo*, tal como por PEGilación, HESilación, PASilación, glicosilación, o pueden producirse como una Fc-fusión o en variantes desimmunizadas. Dicha unión puede ser covalente o no covalente, tal como se entiende por los expertos en la técnica.

Como se usa aquí, el término “operativamente unido” se refiere a una disposición de elementos en donde los dominios se configuran de manera que funcionen como una unidad para el propósito para el que están destinados. El término no requiere que los dominios sean inmediatamente adyacentes en el polipéptido, ya que las secuencias espaciador/enlazador pueden estar presentes entre los dominios, cuyas longitudes pueden ser bastante variables. En una realización no limitante, la longitud del espaciador entre dos dominios cualquiera de los polipéptidos de fibras AdB-2/3 recombinantes puede estar entre aproximadamente 0 aminoácidos y aproximadamente 20 aminoácidos. En otras varias realizaciones no limitantes, la longitud del espaciador puede ser 0-20, 0-19, 0-18, 0-17, 0-16, 0-15, 0-14, 0-13, 0-12, 0-11, 0-10, 0-9, 0-8, 0-7, 0-6, 0-5, 0-4, 0-3, 0-2, 0-1, 1-20, 1-19, 1-18, 1-17, 1-16, 1-15, 1-14, 1-13, 1-12, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-20, 2-19, 2-18, 2-17, 2-16, 2-15, 2-14, 2-13, 2-12, 2-11, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-20, 3-19, 3-18, 3-17, 3-16, 3-15, 3-14, 3-13, 3-12, 3-11, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-20, 4-19, 4-18, 4-17, 4-16, 4-15, 4-14, 4-13, 4-12, 4-11, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-20, 5-19, 5-18, 5-17, 5-16, 5-15, 5-14, 5-13, 5-12, 5-11, 5-10, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 6-20, 6-19, 6-18, 6-17, 6-16, 6-15, 6-14, 6-13, 6-12, 6-11, 6-10, 6-9, 6-8, 6-7, 7-20, 7-19, 7-18, 7-17, 7-16, 7-15, 7-14, 7-13, 7-12, 7-11, 7-10, 7-9, 7-8, 8-20, 8-19, 8-18, 8-17, 8-16, 8-15, 8-14, 8-13, 8-12, 8-11, 8-10, 8-9, 9-20, 9-19, 9-18, 9-17, 9-16, 9-15, 9-14, 9-13, 9-12, 9-11, 9-10, 10-20, 10-19, 10-18, 10-17, 10-16, 10-15, 10-14, 10-13, 10-12, 10-11, 11-20, 11-19, 11-18, 11-17, 11-16, 11-15, 11-14, 11-13, 11-12, 12-20, 12-19, 12-18, 12-17, 12-16, 12-15, 12-14, 12-13, 13-20, 13-19, 13-18, 13-17, 13-16, 13-15, 13-14, 14-20, 14-19, 14-18, 14-17, 14-16, 14-15, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 15-16, 16-20, 16-19, 16-18, 16-17, 17-20, 17-19, 17-18, 18-20, 18-19, 19-20, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, o 0 aminoácidos de longitud.

Como se usa aquí, “polipéptido recombinante” significa un producto proteico que no ocurre naturalmente, en donde los dominios del polipéptido recombinante se derivan de una o más proteínas o secuencias derivadas artificialmente, tal como los polipéptidos del dominio de protuberancia mutante de la invención. Por ejemplo, cada dominio de eje o motivo de dominio de eje puede derivar de una proteína que ocurre de diferente forma natural. El polipéptido recombinante se puede construir por una variedad de mecanismos que incluyen, pero no se limitan a, técnicas de manipulación de DNA estándar y montaje químico a través de partes de subunidad del polipéptido recombinante. El montaje químico puede conducir a una forma equivalente como una forma genética molecular o asociaciones alternativas con función equivalente. En una realización preferida, el polipéptido recombinante se produce mediante técnicas estándar de DNA recombinante. Las técnicas para dicha producción recombinante y el aislamiento de los polipéptidos recombinantes de la invención se encuentran bien dentro del nivel de experiencia en la técnica basado en lo enseñado aquí.

En otra realización, cada dominio de eje o motivos de dominio de eje se selecciona del grupo que consiste en un dominio de eje Ad3 o motivo de dominio de eje, un motivo de dominio de eje Ad5, un dominio de eje Ad7 o un motivo de dominio de eje, un dominio de eje Ad11 o un motivo de dominio de eje, un dominio de eje Ad14 o motivo de dominio de eje, un motivo de eje Ad14a, o motivo de dominio de eje, combinaciones de los mismos, y equivalentes funcionales de los mismos. El dominio de eje o motivos de dominio de eje necesarios para la dimerización de protuberancia de fibras, que es necesario para la unión a DSG2 y la apertura transitoria resultante de las uniones intercelulares. Como se usa aquí, un “motivo de dominio de eje” es cualquier porción de un dominio de eje que permite la dimerización de protuberancia de fibras de los polipéptidos de fibras AdB-2/3 recombinantes de la invención. Dichos motivos de dominio de eje pueden determinarse fácilmente por los expertos en la técnica, basado en los ejemplos proporcionados a continuación. Por ejemplo, pueden usarse los estudios de resonancia de plasmón superficial (SPR) que utilizan sensores que contienen DSG2 recombinante inmovilizado para determinar si los polipéptidos recombinantes que se están evaluando se unen a DSG2, combinado con estudios de competición de DSG2. Estudios ejemplares adicionales, tales como análisis de pérdida y ganancia de función, se describen en detalle en el Ejemplo 1.

Los polipéptidos recombinantes pueden comprender entre 1 y 22 dominios de eje de polipéptidos de fibras AdB-2/3 o motivos de dominio de eje. Por lo tanto, en diversas realizaciones, los polipéptidos comprenden 1-22, 1-21, 1-20, 1-19, 1-18, 1-17, 1-16, 1-15, 1-14, 1-13, 1-12, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-22, 2-21, 2-20, 2-19, 2-18, 2-17, 2-16, 2-15, 2-14, 2-13, 2-12, 2-11, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-22, 3-21, 3-20, 3-19, 3-18, 3-17, 3-16, 3-15, 3-14, 3-13, 3-12, 3-11, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-22, 4-21, 4-20, 4-19, 4-18, 4-17, 4-16, 4-15, 4-14, 4-13, 4-12, 4-11, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-22, 5-21, 5-20, 5-19, 5-18, 5-17, 5-16, 5-15, 5-14, 5-13, 5-12, 5-11, 5-10, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 6-22, 6-21, 6-20, 6-19, 6-18, 6-17, 6-16, 6-15, 6-14, 6-13, 6-12, 6-11, 6-10, 6-9, 6-8, 6-7, 7-22, 7-21, 7-20, 7-19, 7-18, 7-17, 7-16, 7-15, 7-14, 7-13, 7-12, 7-11, 7-10, 7-9, 7-8, 8-22, 8-21, 8-20, 8-19, 8-18, 8-17, 8-16, 8-15, 8-14, 8-13, 8-12, 8-11, 8-10, 8-9, 9-22, 9-21, 9-20, 9-19, 9-18, 9-17, 9-16, 9-15, 9-14, 9-13, 9-12, 9-11, 9-10, 10-22, 10-21, 10-20, 10-19, 10-18, 10-17, 10-16, 10-15, 10-14, 10-13, 10-12, 10-11, 11-22, 11-21, 11-20, 11-19, 11-18, 11-17, 11-16, 11-15, 11-14, 11-13, 11-12, 12-22, 12-21, 12-20, 12-19, 12-18, 12-17, 12-16, 12-15, 12-14, 12-13, 13-22, 13-21, 13-20, 13-19, 13-18, 13-17, 13-16, 13-15, 13-14, 14-22, 14-21, 14-20, 14-19, 14-18, 14-17, 14-16, 14-15, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 15-16, 16-22, 16-21, 16-20, 16-19, 16-18, 16-17, 17-22, 17-21, 17-20, 17-19, 17-18, 18-22, 18-21, 18-20, 18-19, 19-22, 19-21, 19-20, 20-22, 20-21, 21-22, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,

10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o 22 dominios de eje de la proteína de fibra AdB-2/3 o motivos de dominio de eje. Cuando más de 1 dominio de eje de proteína de fibra AdB-2/3 o motivo de dominio de eje está presente, cada dominio de eje o motivo de dominio de eje pueden ser idénticos, o una o más copias del dominio de eje o motivo del dominio de eje pueden diferir en un sólo polipéptido recombinante. En una realización preferida, el polipéptido de fibra AdB-2/3 recombinante tiene un único dominio de eje o motivo de dominio de eje.

En otra realización, uno o más (o todos) dominios de eje o motivos de dominio de eje en el polipéptido recombinante comprenden o consisten en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEC ID NO: 12:

GVL(T/S)LKC(L/V)(T/N)PLTT(T/A)(G/S)GSLQLKVG(G/S)GLTV(D/T)T(D/N)G
(T/F/S)L(Q/K/E)ENI(G/S/K)(A/V)(T/N)TPL(V/T)K(T/S)(G/N)HSI(G/N)L(S/P)(L/D)G(A/P/
N)GL(G/Q)(T/D)(D/E)(E/Q)NKLC(T/S/A)KLG(E/Q/N)GLTF(N/D)S(N/S)N(I/S)(C/I)(I/A)(D
/N/L)(D/K)N(I/--)NTL;

o SEC ID NO: 43-48:

- 10 Motivo de dominio de eje Ad3: NSIALKNNTL SEC ID NO: 43
Motivo de dominio de eje Ad7: NSNNICINDNINTL SEC ID NO: 44
Motivo de dominio de eje Ad5: GAITVGKNKNDKLT SEC ID NO: 45
Motivo de dominio de eje Ad11: NSNNICIDDNINTL SEC ID NO: 46
Motivo de dominio de eje Ad14: NSNNICIDDNINTL SEC ID NO: 47
15 Motivo de dominio de eje Ad35: GDICIKDSINTL SEC ID NO: 48

En esta secuencia y otras secuencias variables mostradas aquí, los restos variables se indican entre paréntesis, y un “-” indica que el residuo puede estar ausente.

En otra realización, uno o más (o todos) dominios de eje o motivos de dominio de eje en el polipéptido recombinante comprenden o consisten en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEC ID NO 13:

GVLTLKCLTPLTTTGGSLQLKVGGGGLT(V/D)DDTDG(T/F)L(Q/K)ENI(G/S)ATT
PLVKTGHISGL(S/P)LG(A/P)GLGT(D/N)ENKLC(T/A)KLG(E/Q)GLTFNSNNICI(
D/N)DNINTL

o SEC ID NOS: 43-48

En otra realización adicional, uno o más (o todos) de los dominios de eje o motivos de dominio de eje en el polipéptido recombinante comprenden o consisten en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 14 (Ad3), SEC ID NO: 15 (Ad7), SEC ID NO: 16 (Ad11), SEC ID NO: 17 (Ad14), SEC ID NO: 18 (Ad14a), Y SEC ID NO: 43-48.

El dominio de protuberancia del polipéptido de fibra AdB-2/3 comprende o consiste en cualquier realización o combinación de realizaciones del primer aspecto de la invención (es decir, cualquiera de las SEC ID NOS: 1-11); estos dominios del polipéptido se describen en detalle en el primer aspecto de la invención.

Como se usa aquí un “dominio de dimerización” es una secuencia peptídica que promueven la dimerización en el polipéptido recombinante que lo contiene. Cualquier dominio de dimerización adecuado no derivado de AdB-2/3 se puede utilizar en el polipéptido recombinante de la invención, siempre y cuando permita la dimerización del polipéptido recombinante y por lo tanto la unión a DSG2. El dominio de dimerización no es derivado de AdB-2/3, en el sentido que no es un dominio que ocurra de forma natural en un polipéptido de fibra AdB-2/3. Ejemplos no limitantes de los numerosos dominios de dimerización conocidos por los expertos en la técnica y adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a hélices peptídicas que contienen al menos una hélice, o una estructura formada por una hélice, una bobina y otra hélice, etc., estructuras de bobina en espiral, dominios de dimerización dentro de, por ejemplo, muchos receptores de señalización de superficie celular, regiones Fc o regiones de bisagra de un anticuerpo, cremalleras de leucina, dominio N-terminal de proteína STAT, proteína de unión FK506, dominio C-terminal de proteína Lex-A, receptores nucleares, dominio N-terminal de FkpA, proteína carotenoides naranja de *A. máxima*, proteína de matriz M1 de la gripe, neuraminidasa del virus de la gripe, aldolasa fuculosa de *E. coli*; y similares. (Véase, por ejemplo, O'Shea, Science. 254: 539 (1991); Barahmand-Pour y colaboradores, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 211: 121-128 (1996); Klemm y colaboradores, Annu. Rev. Immunol. 16: 569-592 (1998); Klemm y colaboradores, Annu. Rev. Immunol. 16: 569-592 (1998); Ho y colaboradores, Nature. 382: 822-826 (1996); y Pomeranz y colaboradores, Biochem. 37: 965 (1998)). Ejemplos adicionales incluyen los restos 325 a 410 en la proteína E2 del papilomavirus bovino, (Dostatni, N., y colaboradores, EMBO J 7 (1988) 3807-

3816; Haugen, T., y colaboradores, EMBO J 7 (1988) 4245-4253; McBride, A., y colaboradores, EMBO J 7 (1988) 533-539; McBride, A., y colaboradores, Proc Natl Acad Sci USA 86 (1989) 510-514), deiodinasa tipo I (DI): DFLVIYIEEAHASD GW (SEC ID NO: 19) o ADFL—YI—EAH—DGW (SEC ID NO: 20); proteína de la cápside HIV-1: QGPKEPFRDYVDRFYKTLRA (SEC ID NO: 21); motivo de dimerización en la cremallera de leucina de la levadura GCN4: HMKQL D VEEL S NYHL N VARL K VGER (SEC ID NO: 22); proteína antiterminadora transcripcional en la cremallera de leucina en Escherichia coli; y BglG: GVTQLMREMLQLIKFQFSLNYQEESLSYQRLVT (SEC ID NO: 23). En realizaciones preferidas, el dominio de dimerización comprende una o más copias de EVSALEK (**SEC ID NO: 24**) y/o KVSALKE (**SEC ID NO: 25**).

Está bien dentro del nivel de los expertos en la técnica identificar las secuencias peptídicas apropiadas que pueden servir como dominios de dimerización, y los mutantes de las mismas, en los polipéptidos recombinantes de la presente invención. Por ejemplo, la dimerización de los polipéptidos de fibra AdB-2/3 recombinantes pueden evaluarse mediante criterios que incluyen sedimentación en gradientes de sacarosa, resistencia a la proteólisis de la tripsina, y movilidad electroforética en geles de poliacrilamida (Hong y Engler, *Journal of Virology* 70:7071-7078 (1996)).

Los polipéptidos recombinantes pueden comprender uno o más dominios de dimerización no derivados de AdB-2/3. Por lo tanto, en varias realizaciones, el polipéptido recombinante comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más dominios de dimerización no derivados de AdB-2/3. Cuando están presentes múltiples dominios en un polipéptido, se prefiere que cada dominio de dimerización sea el mismo.

En una realización preferida un péptido espaciador se sitúa entre el dominio de dimerización y el uno o más dominios de eje o motivos de dominio del eje. En una realización preferida adicional, el péptido espaciador es un péptido con flexibilidad estructural. Virtualmente se puede utilizar cualquier péptido con flexibilidad estructural. Como ejemplo, el péptido flexible puede comprender repeticiones de restos de aminoácidos, tales como Gly-Gly-Gly-Ser (**SEC ID NO: 26**), o cualquier otra repetición adecuada de restos de aminoácidos. En otra realización, se puede utilizar la región bisagra de un anticuerpo. El espaciador puede ser de cualquier longitud adecuada que mantenga la capacidad del polipéptido recombinante para dimerizar y mantener la unión del polipéptido recombinante a DSG2.

En una realización preferida, el polipéptido AdB-2/3 recombinante comprende uno o más dominios de eje que cada uno comprende o consiste en un dominio de eje de Ad3 (**SEC ID NO: 14**).

Esta realización preferida se puede utilizar con cualquier realización o combinación de realizaciones descritas aquí. Por ejemplo, se puede utilizar cualquier dominio de protuberancia adecuado, y se puede utilizar cualquier dominio de dimerización adecuado, incluyendo pero no limitado a una o más copias de EVSALEK (**SEC ID NO: 24**) y/o KVSALKE (**SEC ID NO: 25**). De forma similar, se puede utilizar cualquier péptido espaciador adecuado entre el dominio de dimerización y el dominio de eje o el motivo de dominio de eje y/o entre el dominio de eje o motivo de dominio de eje y el dominio de protuberancia. En una realización más preferida, el polipéptido AdB-2/3 recombinante comprende o consiste en JO-1 (**SEC ID NO: 27**), o un multímero del mismo (tal como un dímero).

Los polipéptidos recombinantes pueden comprender otros dominios, tales como un dominio para el aislamiento del polipéptido y/o un dominio de detección. Se puede añadir un dominio de aislamiento para facilitar la purificación/aislamiento del polipéptido después, por ejemplo, de la producción del polipéptido recombinante. Se puede utilizar cualquier dominio de aislamiento adecuado, incluyendo pero no limitado a HIS, CBP, CYD (péptido NorpD covalente todavía no disociable), Strep II, FLAG, etiquetas de péptidos HPC (cadena pesada de proteína C), GST y etiquetas de afinidad MBP. Tal como se utiliza aquí, "dominio de detección" significa una o más secuencias de aminoácidos que pueden detectarse. Se puede utilizar cualquier dominio de detección adecuado, incluyendo pero no limitando a, proteínas inherentemente fluorescentes (por ejemplo, proteínas verdes fluorescentes y proteínas fluorescentes de especies de Anthozoa no bioluminiscentes), proteínas fluorescentes o luminiscentes que requieren un cofactor (por ejemplo, ficobiliproteínas o luciferasas), y epítomos reconocibles por anticuerpos específicos u otras sondas de unión naturales o no naturales específicas, que incluyen, pero no se limitan a, colorantes, cofactores enzimáticos y moléculas de unión diseñadas por ingeniería genética, que son marcadas fluorescentemente o luminiscentemente.

En otras realizaciones preferidas, el polipéptido de fibra AdB-2/3 recombinante comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de uno de los siguientes

(a) (M/-)

GSKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEGSGGGSGGGSGGGSNSIAL
KNN
TLWTGPKPEANCHIEYGKQNPDSKLTLLVKNGGIVNGYVTLMGASDYVNTL
FKNKNVSINVELYFDATGHILPDSSSLKTDLELYKQTADFSARGFMPSTTAYPFVLP
NAGTHNENFIFGQCYKASDGALFPLEVTVMNLKRLPDSRTSYVMFTLWSLNAGLA
PETTQATLITSPFTFSYIREDD (SEQ ID NO: 28);

(b) (M/-)

GSKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEGSGGGSGGGSGGGSNSIAL
 KNN
 TLWTGPKPEANCHIEYGKQNPDSKLTLLVKNNGGIVNGYVTLMGASDYVN
 TLFKNKNVSINVELYFDATGHILPDSSSLKTDLELEYKQTADSSARGFMPSTTAYPFV
 LPNAGTHNENYIFGQCYKASDGALFPLEVTVMNLKRLPDSRTSYVMFLWSLNAG
 LAPETTQATLITSPFTFSYIREDD (SEQ ID NO: 29);

(c) (M/-)

GSKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEGSGGGSGGGSGGGSNSIAL
 KNN
 TLWTGPKPEANCHIEYGKQNPDSKLTLLVKNNGGIVNGYVTLMGASDYVNTL
 FKNKNVSINVELYFDATGHILPDSSSLKTDLELYKQTADFSARGFMPSTTAYPFVLP
 NAGTHNENYIFGQCYKASDGALFPLEVTVMNLKRLPDSRTSYVMFLWSLSAGLA
 PETTQATLITSPFTFSYIREDD (SEQ ID NO: 30);

(d) (M/-)

GSKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEGSGGGSGGGSGGGSNSIAL
 KNN
 TLWTGPKPEANCHIEYGKQNPDSKLTLLVKNNGGIVNGYVTLMGASDYVNTL
 FKNKNVSINVELYFDATGHILPDSSSLKTDLELYKQTADFSARGFMPSTTAYPFOLP
 NAGTHNENYIFGQCYKASDGALFPLEVTVMNLKRLPDSRTSYVMFLWSLNAGLA
 PETTQATLITSPFTFSYIREDD (SEQ ID NO: 31);

(e) (M/-)

GSKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEGSGGGSGGGSGGGSNSIAL
 KNN
 TLWTGPKPEANCHIEYGKQNPDSKLTLLVKNNGGLVNGYVTLMGASDYVN
 TLFKNKNVSINVELYFDATGHILPDSSSLKTDLEPKYKQTADFSARGFMPSTTAYPFVL
 PNAGTHNENYIFGQCYEASDGALFPLEVTVMNLKRLPDSRTSYVMFLWSLNAGL
 APETTQATLITSPFTFSYIREDD (SEQ ID NO: 32);

(f) (M/-)

GSKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEGSGGGSGGGSGGGSNSIAL
 KNN
 TLWTGPKPEANCHIEYGKQNPDSKLTLLVKNNGGIVNGYVTLMGASDYV
 NTLFKNKNVSINVELYFDATGHILPDSSSLKTDLELYKQTADLSARGFMPSTTAYPF
 VLPNAGTHNENYIFGQCYKASDGALFPLEVTVMNLKRLPDSRTSYVMFLWSLNA
 GLAPETTQATLITSPFTFSYIREDD (SEQ ID NO: 33);

5

y

(g) (M/-)

GSKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEGSGGGSGGGSGGGSNSIAL
 KNN
 TLWTGPKPEANCHIEYGKQNPDSKLTLLVKNNGGIVNGYVTLMGASDYV
 NTLFKNKNVSINVELYFDATGHILPDSSSLKTDLELYKQTADFSARGFMPSTTAYPF
 VLPNAGTHNGNYIFGQCYEASDGALFPLEVTVMNLKRLPDSRTSYVMFLWSLNA
 GLAPETTQATLITSPFTFSYIREDD (SEQ ID NO: 34).

10

15

En otra realización, los polipéptidos recombinantes están en una forma multimérica, tal como un dímero, trímero, etc. En una realización preferida, un multímero comprende un dímero formado por dimerización a través de los dominios de dimerización en cada homotrímero (es decir, un polipéptido es un homotrímero mediante la trimerización del dominio de protuberancia). En forma multimérica (tal como un dímero), los polipéptidos recombinantes comprenden multímeros de fibra AdB-2/3, y se pueden utilizar en los diversos métodos de la invención descritos anteriormente. Como comprenderán los expertos en la técnica, tales multímeros pueden comprender multímeros de polipéptidos recombinantes idénticos de la invención, o pueden comprender multímeros de diferentes polipéptidos recombinantes de la invención. En una realización, los dominios de dimerización son los mismos en cada polipéptido recombinante que forma parte del multímero. En otra realización, los dominios de dimerización son diferentes en cada polipéptido recombinante que forma parte del multímero. En otra realización, los dominios de eje y/o protuberancia son los

mismos en cada polipéptido recombinante que forma parte del multímero. En otra realización, los dominios de eje y/o de protuberancia son diferentes en cada polipéptido recombinante que forma parte del multímero.

La multimerización de fibras AdB-2/3 se puede determinar de acuerdo con los métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la multimerización de las construcciones de fibras AdB-2/3 recombinantes se puede evaluar mediante criterios que incluyen sedimentación en gradientes de sacarosa, resistencia a la proteólisis de tripsina, y movilidad electroforética en geles de poliácridamida (Hong y Engler, *Journal of Virology* 70:7071-7078 (1996)). Con respecto a la movilidad electroforética, el multímero fibroso es un complejo muy estable y funcionará con un peso molecular consistente con el de un multímero cuando la muestra no se hierva antes del SDS-PAGE. Después de hervir, sin embargo, la estructura multimérica se rompe y la proteína pasa posteriormente a un tamaño consistente con el monómero de proteína.

Los polipéptidos recombinantes, o versiones multiméricas de los mismos, pueden almacenarse en disolución o congelarse.

En otra realización, los polipéptidos recombinantes de la invención se combinan con (tal como conjugado con) uno o más agentes terapéuticos para un trastorno asociado con el tejido epitelial. Tales conjugados se pueden utilizar, por ejemplo, en los métodos terapéuticos de la invención. Los métodos para conjugar los polipéptidos de la invención con un agente terapéutico de interés, tales como por unión covalente o reticulación química, son bien conocidos por los expertos en la técnica. Cualquier agente terapéutico adecuado se puede utilizar para formar un conjugado de acuerdo con esta realización de la invención, incluyendo pero no limitado a compuestos degradantes de estroma tumoral (tal como relaxina), agentes alquilantes, inhibidores de angiogénesis, anticuerpos, antimetabolitos, antimitóticos, antiproliferativos, inhibidores de aurora quinasa, inhibidores de promotores de apoptosis (por ejemplo, Bcl-1-xL, Bcl-1-w y Bcl-1), activadores de la vía del receptor de la muerte, inhibidores Bcr-Abl quinasa, anticuerpos BiTE (Bi-Specific T-cell Engager), modificadores de la respuesta biológica, inhibidores de quinasa dependiente de ciclina, inhibidores del ciclo celular, inhibidores de ciclooxigenasa 2, inhibidores del factor del crecimiento, inhibidores de la proteína de choque térmico (HSP)-90, agentes de desmetilación, inhibidores de histona desacetilasa (HDAC), terapias hormonales, inmunológicas, inhibidores de proteínas de apoptosis (IAPs) que intercalan antibióticos, inhibidores de quinasa, objetivos mamíferos de los inhibidores de rapamicina, inhibidores de la quinasa regulada por señal extracelular activada por mitógenos de microRNA, proteínas de unión multivalentes, fármacos anti inflamatorios no esteroideos (NSAIDs), inhibidores de poli ADP (adenosina difosfato)-ribosa polimerasa (PARP), agentes quimioterapéuticos de platino, inhibidores de quinasa de tipo polo (plk), inhibidores de proteasoma, análogos de purina, análogos de pirimidina, inhibidores del receptor de tirosina quinasa, alcaloides de plantas retinoides/deltoides, ácidos nucleicos inhibidores pequeños (siRNAs), inhibidores de topoisomerasa y similares.

Ejemplos de agentes terapéuticos que entran dentro de estas diversas clases incluyen, pero no se limitan a: docetaxel, doxorubicina, irinotecan, paclitaxel (Taxol®), partículas ligadas a la albumina del paclitaxel (Abraxane®), doxorubicina HCl liposoma (Doxil®), anticuerpos BiTE tales como adecatumumab (Micromet MT201), blinatumomab (Micromet MT103) y similares, agentes terapéuticos basados en siRNA, agentes alquilantes que incluyen altretamina, AMD-473, AP-5280, apaziquona, bendamustina, brostalicina, busulfan, carboquone, carmustina (BCNU), clorambucil, CLORETAZINE® (laromustina, VNP 40101M), ciclofosfamida, dacarbacina, decitabina, 5'-azacitidina, estramustina, fotemustina, glufosfamida, ifosfamida, KW-2170, lomustina (CCNU), mafosfamida, melfalan, mitobronitol, mitolactol, nimustina, N-óxido de mostaza de nitrógeno, ranimustina, temozolomida, tiotepa, TREANDA® (bendamustina), treosulfan, rofosfamida y similares; inhibidores de angiogénesis que incluyen inhibidores del receptor específico endotelial de tirosina quinasa (Tie-2), inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), inhibidores del receptor del factor de crecimiento de la insulina 2 (IGFR-2), inhibidores de la matriz de la metaloproteínasa 2 (MMP-2), inhibidores de la matriz de la metaloproteínasa-9 (MMP-9), inhibidores del receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR), análogos de trombospondina, inhibidores del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular de la tirosina quinasa (VEGFR) y similares; antimetabolitos que incluyen ALIMTA® (pemetrexed disódico, LY231514, MTA), 5-azacitidina, XELODA® (capecitabina), carmofur, LEUSTAT® (cladribina), clofarabina, citarabina, ocfosfato de citarabina, citosina arabinosida, decitabina, deferroxamina, doxifluridina, eflornitina, EICAR (5-etinil-1-beta-D-ribofuranosilimidazol-4-carboxamida), enocitabina, etnilcitidina, fluradabina, 5-fluorouracilo solo o en combinación con leucovorina, GEMZAR® (gemcitabina), hidroxiaurea, ALKERAN® (melfalan), mercaptopurina, 6-mercaptopurina ribosida, metotrexato, análogos de metotrexato (tales como trimetrexato y pralatraxato), ácido micofenólico, nelarabina, nolatrexed, ocfosfato, pelitrexol, pentostatina, raltitrexed, ribavirina, triapina, trimetrexato, S-1, tiazofurina, tegafur, TS-1, vidarabina, y similares; inhibidores de la proteína Bcl-2 que incluyen AT-101 ((-)-gospol), GENASENSE® (G3139 u oblimersen (oligonucleótido antisentido dirigido a Bcl-2), IPI-194, IPI-565, N-(4-(4-((4'-cloro(1,1'-bifenil)-2-il)metil)piperazin-1-il)benzoílo)-4-(((1R)-3-(dimetilamino)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-nitrobenzenosulfonamida) (ABT-737, N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)-5,5-dimetil-1-ciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoílo)-4-(((1R)-3-(morfolin-4-il)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-((trifluorometil)sulfonyl)benzenosulfonamida (ABT-263), GX-070 (obatoclax) y similares; inhibidores de Bcr-Abl quinasa incluyen DASATINIB® (BMS-354825), GLEEVEC® (imatinib) y similares; inhibidores CDK que incluyen AZD-5438, BMI-1040, BMS-032, BMS-387, CVT-2584, flavopiridol, GPC-286199, MCS-5a, PD0332991, PHA-690509, seliciclib (CYC-202, R-roscovitina), ZK-304709 y similares; inhibidores EGFR que incluyen ABX-EGF, inmunoliposomas anti-EGFR, vacuna EGF, EMD-7200, ERBITUX® (cetuximab), HR3, anticuerpos IgA, IRESSA® (gefitinib), TARCEVA® (erlotinib o OSI-774), TP-38, proteína de fusión EGFR, TYKERB® (lapatinib) y similares; inhibidores del receptor ErbB2 incluyen CP-724-714, CI-

1033 (canertinib), HERCEPTIN® (trastuzumab), TYKERB® (lapatinib) OMNITARG® (2C4, petuzumab), TAK-165, GW-572016 (ionafarnib), GW-282974, EKB-569, PI-166, dHER2 (vacuna HER2), APC-8024 (vacuna HER-2), anticuerpo bisespecífico anti-HER/2neu, B7.her2IgG3, anticuerpos bisespecíficos trifuncionales AS HER2, mAb Ar-209, mAb 2B-1 y similares; inhibidores de histona desacetilasa incluyen romidepsin, LAQ-824, MS-275, trapoxina, ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA), TSA, ácido valproico y similares; inhibidores HSP-90 que incluyen 17-AAG-nab, 17-AAG, CNF-101, CNF-1010, CNF-2024, 17-DMAG, geldanamicina, IPI-504, KOS-953, MYCOGRAB® anticuerpo recombinante humano a HSP-90), NCS-683664, PU24FCI, PU-3, radicol, SNX-2112, STA-9090, VER49009 y similares; activadores de la vía del receptor de la muerte que incluyen TRAIL, anticuerpos u otros agentes que dirigen a TRAIL o a los receptores de la muerte (por ejemplo, DR4 y DR5) tales como Apomab, conatumumab, ETR2-ST01, GDC0145, (lexatumumab), HGS-1029, LBY-135, PRO-1762 y trastuzumab; agentes quimioterapéuticos de platino incluyen cisplatino, ELOXATIN® (oxaliplatino) eptaplatino, lobaplatino, nedaplatino, PARAPLATIN® (carboplatino), satraplatino, picoplatino y similares; inhibidores VEGFR que incluyen AVASTIN® (bevacizumab), ABT-869, AEE-788, axitinib (AG-13736), AZD-2171, CP-547,632, IM-862, MACUGEN (pegaptamib), NEXAVAR® (sorafenib, BAY43-9006), pazopanib (GW-786034), vatalanib (PTK-787, ZK-222584), SUTENT® (sunitinib, SU-11248), trampa de VEGF, ZACTIMATHi (vandetanib, ZD-6474) y similares; terapia celular dendrítica (sipuleucel-T, Provenge®); inhibidores de topoisomerasa que incluyen aclarubicina, 9-aminocamptotecina, amonafida, amsacrina, becatecarina, belotecan, BN-80915, CAMPTOSAR® (clorhidrato de irinotecan), campotecina, dexrazoxina, diflomotecan, edotecarina, ELLENCE® o PHARMORUBICIN® (epirubicina), etopoxide, exatecan, abraxane, irinotecan, 10-hidroxicamptotecina, gimatecan, lurtotecan, mitoxantrone, oratecina, pirarubicina, pixantrona, rubitecan, sobuzoxano, SN-38, Tafluposide, topotecan y similares; anticuerpos que incluyen AVASTIN® (bevacizumab), anticuerpos específicos de CD40, eHTNT-1/B, denosumab, ERBITUX® (cetuximab), HUMAX-CD4® (zanolimumab), anticuerpos específicos de IGF I R, lintuzumab, PANOREX® (edrecolomab), RENCAREX® (WX G250), RITUXAN® (rituximab), ticilimumab, trastuzimab y similares; terapias hormonales que incluyen ARIMIDEX® (anastrozol), AROMASIN® (exemestano), arzoxifeno, CASODEX® (bicalutamida), CETROTIDE® (cetorelix), degarelix, desloreline, DESOPAN® (trilostano), dexametasona, DROGENIL® (flutamida), EVISTA® (raloxifeno), AFEMA® (fadrozol), FARESTON® (toremifeno), FASLODEX® (fulvestrant), FEMARA® (letrozol), formestano, glucocorticoides, HECTOROL® (doxercalciferol), RENAGEL® (carbonato de sevelamer), lasofoxifeno, acetato de leuprolida, MEGACE® (megestrol), MIFEPREX® (mifepristona), NILANDRON® (nilutamida), NOLVADEX® (citrate de tamoxifeno), PLENAXIS® (abarelix), prednisona, PROPECIA® (finasteride), rilostano, SUPREFACT® (buserelin), TRELSTAR® (hormonas liberadoras de hormonas luteinizantes (LHRH)), VANTAS® (implante de histrelina), VETORYL® (trilostano o modrastano), ZOLADEX® (fosrelina, goserelina) y similares; inmunológicos que incluyen interferón alfa, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón beta, interferón gamma-1a, ACTIMMUNE® (interferón gamma-1b) o interferón gamma-n1, combinaciones de las mismas y similares. Otros agentes incluyen ALFAFERONE® (IFN-alfa), BAM-002 (glutaciona oxidada), BEROMUN® (tasonermina), BEXXAR® (tositumomab), CAMPATH® (alemtuzumab), CTLA4 (antígeno 4 del linfocito T citotóxico), decarbacina, denileucina, epratuzumab, GRANOCYTE® (lenograstim), lentinan, interferón alfa de leucocitos, imiquimod, MDX-010 (anti CTLA-4), vacuna de melanoma, mitumomab, molgramostim, MYLOTARG.TM. (gemtuzumab ozogamicina), NEUPOGEN® (filgrastim), Onco VAC-CL, OVAREX® (oregovomab), pemtumomab (Y-muHMFGI), PROVENGE® (sipuleucel-T), sargaramostim, sizoflan, teceleucina, THERACYS® (Bacillus Camette-Guerin), ubenimex, VIRULIZIN® (inmunoterapéutico, Lorus Pharmaceuticals), Z-100 (Sustancia específica de Maruyama (SSM)), WF-10 (Tetraclorodecaóxido (TCDO)), PROLEUKIN® (aldesleucina), ZADAXIN® (timalfasina), ZENAPAX® (daclizumab), ZEVALIN® (90Y-Ibritumomab tiuxetan) y similares; ofatumumab; agentes modificadores de la respuesta biológica que incluyen krestina, lentinan, sizofurano, picibanil PF-3512676 (CpG-8954), ubenimex y similares; análogos de pirimidina incluyen citarabina (ara C o Arabinósido C), citoxina arabinósido, doxifluridina, FLUDARA® (fludarabina), 5-FU (5-fluorouracilo), floxuridina, GEMZAR® (gemcitabina), TOMUDEX® (ratitrexed), TROXATYL® (triacetiluridina troxacitabina) y similares; análogos de purina que incluyen LANVIS® (tioguanina) y PURI-NETHOL® (mercaptipurina); agentes antimitóticos que incluyen batabulina, epotilona D (KOS-862), N-(2-((4-hidroxifenil)amino)piridin-3-il)-4-metoxibencenosulfonamida, ixabepilona (BMS 247550), paclitaxel, TAXOTERE® (docetaxel), PNU100940 (109881), patupilona, XRP-9881 (larotaxel), vinflunina, ZK-EPO (eptilona sintética) y similares; y otros agentes quimioterapéuticos tales como ABRAXANE® (ABI-007), ABT-100 (inhibidor de farnesil transferasa), ADVEXIN® (vacuna Ad5CMV-p53), ALTOCOR® o MEVACOR® (lovastatina), AMPLIGE® (poli I, poli C12U, un RNA sintético), APTOSYN® (exisulind), AREDIA® (ácido pamidrónico), arglabina, L-asparaginasa, atamestano (1-metil-3,17-diona-androsta-1,4-dieno), AVAGE® (tazaroteno), AVE-8062 (derivado de combreastatina), BEC2 (mitumomab), cachectina o cachesina (factor de necrosis tumoral), canvaxina (vacuna), CEAVAC® (vacuna contra el cáncer), CELEUK® (celmoleucina), CEPLENE® (diclorhidrato de histamina), CERVARIX® (vacuna del papilomavirus humano), CHOP® (C; CYTOXAN®) (ciclofosfamida); H: ADRIAMYCIN® (hidroxidoxorubicina): O: Vincristina (ONCOVIN®); P: prednisona, CYPAT® (acetato de ciproterona), combrestatina A4P, DAB(389)EGF (dominios catalíticos y de translocación de la toxina diftérica fusionada mediante un ligador His-Ala al factor de crecimiento epidérmico humano) o TransMID-107R® (toxinas diftéricas), dacarbacina, dactinomomicina, ácido 5,6-dimetilxantenona-4-acético (DMXAA), eniluracilo, EVIZON.TM. (lactato de escualamina), DIMERICINE® (loción de liposomas T4N5), discodermolida, DX-8951f (mesilato de extecan), enzastaurina, EPO906 (eptilona B), GARDASIL® (vacuna recombinante cuadrivalente del papilomavirus humano (Tipos 6, 11, 16, 18)), GASTRIMMUNE®, GENASENSE®, GMK (vacuna conjugada con gangliósidos), GVAX® (vacuna contra el cáncer de próstata), halofuginona, histerelina, hidroxycarbamida, ácido ibandronico, IGN-101, IL-13-PE38, IL-13-PE38QQR (cintredequina besudotox), IL-13-pseudomonas exotoxina, interferón-alfa., interferón-gamma., JUNOVAN® o MEPACT® (mifamurtida), Ionafarnib, 5,10-metilentetrahidrofolato, miltefosina (hexadecilfosfocolina), NEOVASTAT®

(AE-941), NEUTREXIN® (trimetrexato glucuronato), NIPENT® (pentostatina), ONCONASE® (una enzima ribonucleasa), ONCOPHAGE® (tratamiento con vacuna de melanoma), ONCOVAX® (vacuna IL-2), ORATHECIN® (rubitecan), OSIDEM® (fármaco celular basado en anticuerpos), OVAREX® MAb (anticuerpo monoclonal murino), paclitaxel, PANDIMEX® (saponinas de aglicona de ginseng que comprenden 20(S)protopanaxadiol (aPPD) y 20(S)protopanaxatriol (aPPT), panitumumab, PANVAC®-VF (vacuna de investigación contra el cáncer), pegaspargasa, PEG interferón A, fenoxodiol, procarbacin, rebimstat, REMOVAB® (catumaxomab), REVLIMID® (lenalidomida), RSR13 (efaproxiral), SOMATULINE®LA (lanreotida), SORIATANE® (acitretina), estaurosporina (Estreptomices estaurosporas), talabostat (PT100), TARGRETIN® (bexaroteno), TAXOPREXIN® (DHA-paclitaxel), TELCYTA® (canfosfamida, TLK-286), temilifeno, TEMODAR® (temozolomida), tesmilifeno, talidomida, THERATOPE® (STn-KLH), timitaq (diclorhidrato de (2-amino-3,4-dihidro-6-metil-4-oxo-5-(4-piridiltio)quinazolina), TNFERADE® (adenovector: portador de DNA que contiene el gen para el factor-alfa de la necrosis tumoral), TRACLEER® o ZAVESCA® (bosentan), tretinoina (Retina-A), tetrandrina, TRISENOX® (trióxido de arsénico), VIRULIZIN®, ukraina (derivado de alcaloides de la planta de celandina mayor), vitaxina (anticuerpo anti-alfavbeta3), XCYTRIN® (motexafina gadolinio), XINLAY® (atrasentan), XYOTAX® (paclitaxel poliglumex), YONDELIS® (trabectedina), ZD-6126, ZINECARD® (dexrazoxano), ZOMETA® (ácido zolendróico), crizotinib, zorubicina y similares.

En otra realización preferida, el agente terapéutico comprende un compuesto que se une a la desmogleina-2; preferiblemente un compuesto que se une a DSG2 y abre las uniones estrechas.

En otras realizaciones, el agente terapéutico comprende partículas radiactivas/terapia de radiación. Cualquier terapia o partícula radiactiva adecuada se puede utilizar según se considere apropiado por un médico asistente, incluyendo pero sin estar limitado a cobalto-60, yodo-131, iridio-192, estroncio-89, samario 153, renio-186 y plomo-212.

En una realización preferida, el agente terapéutico es un agente terapéutico anti tumoral y comprende un agente quimioterapéutico o anticuerpo monoclonal anti tumoral como se describe aquí. En una realización preferida adicional, el agente terapéutico anti tumoral comprende un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en trastuzumab, cetumiximab, petuzumab, apomab, conatumumab, lexatumumab, bevacizumab, bevacizumad, denosumab, zanolimumab, lintuzumab, edrecolomab, rituximab, ticilimumab, tositumomab, alemtuzumab, epratuzumab, mitumomab, gemtuzumab ozogamicina, oregovomab, pentumomab daclizumab, panitumumab, catumaxomab, ofatumumab, y ibritumomab. Ejemplos no limitantes de mAb anti tumoral útiles y sus usos específicos se listan en la Tabla 1, y se describen adicionalmente en Campoli, M. y colaboradores, *Principles & Practice of Oncology* 23(1&2):1-19 (2009).

Tabla 1: mAbs específicos de antígeno tumoral para el tratamiento del cáncer

Anticuerpo	Isotipo	Diana	Indicación de la enfermedad
SGN-75	IgG1 Humanizado	CD70	Tumores sólidos, incluyendo cáncer de células renales, CD70 + tumores malignos hematológicos
Trastuzumab	IgG1 Humanizado	HER2/neu	Cáncer de mama HER2/neu(+)*
Cetuximab	IgG1 quimérico	EGFR	Cáncer de colon EGFR(+)*
Panitumumab	IgG2 totalmente humanizado	EGFR	Cáncer de colon EGFR(+)*
Matuzumab	IgG1 Humanizado	EGFR	Cáncer de pulmón de células no escamosas no pequeñas (NSCLC), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), cáncer de mama y de páncreas, cáncer de colon (CC)
Pertuzumab	IgG1 Humanizado	EGFR	NSCLC, HNSCC, CC, cáncer de mama y de ovario
Ipilimumab (MDX-010)	IgG1 Humanizado	CTLA-4	NSCLC, RCC, melanoma metastásico
Tremelimumab (CP-675, 206)	IgG1 Humanizado	CTLA-4	NSCLC, RCC, melanoma metastásico
Sibrotuzumab	IgG1 Humanizado	FAP**	NSCLC, CC

Anticuerpo	Isotipo	Diana	Indicación de la enfermedad
Mapatumumab específico de DR-4 (TRM-1, HGS-ETR1)	IgG1 Humanizado	TRAIL	NSCLC, CC, cáncer de ovario, mieloma múltiple
Lexatumumab específico de DR-5 (HGS-ETR2, TRA-8)	IgG1 Humanizado	TRAIL	Tumores sólidos
Cantuzumab mertasina	IgG1 Humanizado Maytansinoide	CanAg***	CC, cáncer de páncreas
Bevacizumab (Avastina)	IgG1 Humanizado	Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	Cáncer de colon*, cáncer de pulmón de células no escamosas no pequeñas (NSCLC)*, cáncer de mama metastásico*

En otra realización, los polipéptidos recombinantes de la invención se combinan con (así como se conjugan con) uno o más agentes de diagnóstico o de formación de imágenes. Los polipéptidos recombinantes de la invención, y multímeros de los mismos, tienen una amplia aplicación para la administración de cualquier agente de diagnóstico, de formación de imagen, u otro compuesto al tejido epitelial que comprende uniones intercelulares donde el acceso a una diana de interés puede estar limitado. En varias realizaciones no limitantes, los agentes de formación de imagen pueden incluir cualquier compuesto químico que pueda producir una señal detectable, o directa o indirectamente. Muchos de dichos agentes de formación de imágenes son conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos de agentes de formación de imágenes adecuados para su uso en los métodos y composiciones descritas son isótopos radiactivos, moléculas fluorescentes, partículas magnéticas (incluyendo nanopartículas), partículas metálicas (incluyendo nanopartículas), moléculas fosforescentes, enzimas, anticuerpos, ligandos, y combinaciones de los mismos, mientras que los agentes de diagnóstico pueden comprender un compuesto que es un marcador de diagnóstico para un trastorno epitelial particular unido a dicho agente de formación de imagen. Los métodos para detectar y medir las señales generadas por los agentes de formación de imágenes son también conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los isótopos radiactivos pueden detectarse por conteo de centello o visualización directa; las moléculas fluorescentes pueden detectarse con espectrofotómetros fluorescentes; las moléculas fosforescentes pueden detectarse con un espectrofotómetro o visualizadas directamente con una cámara; las enzimas pueden detectarse por detección o visualización del producto de una reacción catalizada por la enzima; anticuerpos pueden detectarse detectando una etiqueta de detección secundaria acoplada al anticuerpo. En una realización preferida, el agente de formación de imágenes y/o el agente de diagnóstico es uno que se puede utilizar para detectar un tumor, ya sea por unión directa al tumor, o por acoplamiento del agente de formación de imagen o diagnóstico con un compuesto que se puede unir al tumor.

En diversas realizaciones, el agente de formación de imágenes puede ser un agente de formación de imagen fluorescente, mientras que los agentes de diagnóstico pueden comprender un compuesto que es un marcador de diagnóstico para un trastorno epitelial particular unido a un agente de formación de imagen fluorescente. Un agente de formación de imágenes fluorescente es cualquier resto químico que tiene una señal de fluorescencia detectable. Este agente de formación de imagen puede utilizarse sólo o en combinación con otros agentes de formación de imagen. Ejemplos de agentes fluorescentes adecuados que pueden utilizarse en las composiciones y en los métodos descritos aquí incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína (FITC), 5-carboxifluoresceína-N-hidroxisuccinimida éster, 5,6-carboximetilfluoresceína, nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il (NBD), fluorescamina, OPA, NDA, colorante indocianina verde, los colorantes cianina (por ejemplo, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5 y Cy7), ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbene-2,2'-disulfónico, acridina, isotiocianato de acridina, ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS), 4-amino-N-[3-vinilsulfonyl]fenilnaftalimida-3,5-disulfonato, N-(4-anilino-1-naftil)maleimida, antranilamida, BODIPY, Amarillo brillante, cumarina, 7-amino-4-metilcumarina (AMC, Coumarina 120), 7-amino-4-trifluorometilcumarina (Coumaran 151), cianosina, 4',6-diaminodino-2-fenilindol (DAPI), 5',5''-dibromopirgalol-sulfonaftaleína (Bromopirgalol rojo), 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina, pentaacetato de dietilentríamina, ácido 4,4'-diisotiocianatodihidro-estilbene-2,2'-disulfónico, ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbene-2,2'-disulfónico, cloruro de 5-[dimetilamino]naftaleno-1-sulfonylo (DNS, cloruro de dansilo), ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABCYL), 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC), eosina, isotiocianato de eosina, eritrosina B, eritrosina, isotiocianato, bromuro de etidio, etidio, 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazina-2-il)aminofluoresceína (DTAF), 2'.7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), isotiocianato de fluoresceína, IR144, IR1446, isotiocianato verde de malaquita, 4-metilumbeliferona, orto cresoltaleína, nitrotirosina, pararosnilina, rojo fenol, B-ficoeritrina, o-ftaldialdehído, pireno, pirenobutirato, succinimidil 1-pirenobutirato, Reactivo rojo 4 (Cibacron[R] rojo brillante 3B-A), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxyrodamina (R6G), lisamina rodamina B cloruro de sulfonylo rodamina (Rhod), 5,6-tetrametil rodamina, rodamina B, rodamina 123, isotiocianato de rodamina X, sulforodamine B, sulforodamine 101, cloruro de sulfonylo derivado de sulforodamine 101 (Rojo Texas), N, N, N', N'-tetrametil-6-carboxyrodamine (TAMRA),

tetrametilrodamime, isotiocianato de tetrametilrodamine (TRITC), riboflavina, ácido rosólico, cumarina-6, y similares, incluyendo combinaciones de los mismos. Estos restos de imágenes fluorescentes pueden obtenerse de una variedad de fuentes comerciales, incluyendo Molecular Probes, Eugene, Oreg. And Research Organics, Cleveland, Ohio, o pueden sintetizarse por los expertos en la técnica.

En otro ejemplo, los agentes de formación de imágenes pueden comprender un agente de formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), mientras que los agentes de diagnóstico pueden comprender un compuesto que es un marcador de diagnóstico para un trastorno epitelial particular unido al agente MRI. Un agente MRI es cualquier resto químico que tiene una señal de resonancia magnética detectable o que puede influir (por ejemplo, aumentar o cambiar) la señal de resonancia magnética de otro agente. Este tipo de agente de formación de imagen puede utilizarse solo o en combinación con otro agente de imagen. En otro ejemplo más, un agente MRI basado en gadolinio puede servir como un agente de formación de imagen. Un ejemplo de agente MRI adecuado que puede incorporarse en los agentes de formación de imágenes descritos es el ácido para-amino-bencil dietilentriaminopentaacético (*p*-NH₂-Bz-DTPA, Compuesto 7), una forma conjugable del ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), que es conocido por su fuerte adhesión al gadolinio y está aprobado para su uso clínico como un agente de contraste de resonancia magnética. La incorporación de un agente de MRI en una macromolécula grande tal como un sustrato dendrímico como se describe aquí puede permitir una relajación de T1 grande (alto contraste) y múltiples copias de un agente en una sola molécula, lo que puede aumentar la señal. Por combinación de una agente de formación de imagen MRI y, por ejemplo, un agente de formación de imagen fluorescente, el agente resultante se puede detectar, visualizar y seguir en tiempo real mediante MRI. Otros agentes de formación de imágenes incluyen agentes PET que pueden prepararse incorporando un ¹⁸F o un quelante para ⁶⁴Cu o ⁶⁸Ga. También, la adición de un radionúclido puede utilizarse para facilitar la formación de imágenes SPECT o la administración de una dosis de radiación, mientras los agentes de diagnóstico pueden comprender un compuesto que es un marcador de diagnóstico para un trastorno epitelial particular unido al agente PET.

En algunas realizaciones, el agente de diagnóstico es un agente de formación de imagen de diagnóstico, incluyendo pero no limitado a agentes de tomografía de emisión de posición (PET), agentes de tomografía computarizada (CT), agentes de formación de imagen por resonancia magnética (MRI), agentes de formación de imagen magnética nuclear (NMI), agentes de fluoroscopia y agentes de contraste de ultrasonido. Tales agentes de diagnóstico incluyen radioisótopos de dichos elementos como yodo (I), incluyendo ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I, etc., Bario (Ba), gadolinio (Gd), Tecnecio (Tc), incluyendo ⁹⁹Tc, fósforo (P), incluyendo ³¹P, hierro (Fe), manganeso (Mn), talio (Tl), cromo (Cr), incluyendo ⁵¹Cr, carbono (C), incluyendo ¹⁴C, o similares, compuestos marcados fluorescentemente, o sus complejos, quelatos, aductos y conjugados. Cualquier agente PET adecuado puede utilizarse, incluyendo pero no limitado a carbono-11, nitrógeno-13, oxígeno-15, fluor-18, ¹¹C-metomidato, y análogos de glucosa de los mismos, incluyendo pero no limitado a fludeoxiglucosa (un análogo de glucosa marcado con fluor-18).

En otras realizaciones, el agente de diagnóstico es un gen marcador que codifica proteínas que son fácilmente detectables cuando se expresan en una célula (incluyendo, pero no limitado a, betagalactosidasa, proteína fluorescente verde, luciferasa, y similares) y sondas de ácidos nucleicos marcados (por ejemplo, sondas radiomarcadas o marcadas fluorescentemente). En algunas realizaciones, la conjugación covalente de agentes de diagnóstico y de formación de imágenes a los multímeros de AdB-2/3 proporcionados aquí se consigue de acuerdo con una variedad de procesos de conjugación. En otras realizaciones el agente de diagnóstico no está asociado covalentemente con los multímeros de AdB-2/3 proporcionados.

En otro aspecto, la presente invención proporciona ácidos nucleicos que codifican el polipéptido o cualquier realización de la invención. Los ácidos nucleicos pueden comprender RNA o DNA, y pueden prepararse y aislarse utilizando técnicas de biología molecular estándar, basándose en las enseñanzas de aquí. Los ácidos nucleicos pueden comprender dominios adicionales útiles para promover la expresión y/o purificación de la proteína codificada, incluyendo pero no limitado a secuencias poliA, secuencias Kozak modificadas, y secuencias que codifican etiquetas de epítipo, señales de exportación, y señales secretoras, señales de localización nuclear, y señales de localización de membranas plasmáticas.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona vectores de expresión recombinantes que comprenden el ácido nucleico de cualquier aspecto de la invención operativamente unido a un promotor. El "vector de expresión recombinante" incluye vectores que unen operativamente una región o gen codificante de ácido nucleico a cualquier promotor capaz de efectuar la expresión del producto génico. La secuencia del promotor utilizada para dirigir la expresión de los ácidos nucleicos descritos en un sistema de mamífero puede ser constitutiva (dirigida por cualquiera de una variedad de promotores, incluyendo pero no limitado a, CMV, SV40, RSV, actina, EF) o inducible (dirigida por cualquiera de un número de promotores inducibles incluyendo, pero no limitada a, tetraciclina, ecdisona, sensible a los esteroides). La construcción de los vectores de expresión para su uso en la transfección de células procarióticas es también bien conocida en la técnica, y por lo tanto puede realizarse mediante técnicas estándar. (Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch, y Maniatis, en: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; *Gene Transfer and Expression Protocols*, pp. 109-128, ed. E.J. Murray, The Humana Press, Inc., Clifton, N.J.), y el catálogo Ambion 1998 (Ambion, Austin, TX). El vector de expresión puede ser replicable en los organismos huésped o como un episoma o por integración en el DNA cromosómico del huésped, y puede comprender cualquier otro componente que se considere apropiado para un uso dado, incluyendo pero no limitado a marcadores de selección tales como un gen de resistencia a antibióticos.

En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona células huésped que comprenden los vectores de expresión recombinantes descritos aquí, y descendientes de los mismos, en donde las células huésped pueden ser procarióticas o eucarióticas. Las células pueden estar transitoriamente o establemente transfectadas. Dicha transfección de los vectores de expresión en células procarióticas o eucarióticas puede llevarse a cabo mediante cualquier técnica conocida en la técnica, incluyendo pero no limitado a transformaciones bacterianas estándar, co-precipitación de fosfato cálcico, electroporación, o mediado por liposoma, mediado por dextran DEAD, mediado por policationico, o transfección mediada por virus. (Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook, y colaboradores, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press; *Culture of Animal Cells: A Manual of basic Technique*, 2nd Ed. (R.I. Freshney. 1987. Liss, Inc. New York, NY). Las técnicas que utilizan células cultivadas transfectadas con vectores de expresión para producir cantidades de polipéptidos son bien conocidas en la técnica.

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas, que comprenden

un multímero de fibra AdB-2/3 de la presente invención; y

un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El multímero de fibra AdB-2/3 puede ser cualquier multímero tal como se describe aquí de acuerdo con cualquier aspecto, realización, o combinación de realizaciones de la invención que incorpora un polipéptido de dominio de protuberancia mutante de cualquier realización del primer aspecto de la invención (es decir, **SEC ID NO: 1-11**).

La composición farmacéutica puede además comprender uno o más agentes terapéuticos para tratar un trastorno asociado al tejido epitelial, incluyendo pero no limitado a aquellos descritos anteriormente. En una realización preferida, el agente terapéutico es un agente terapéutico anti tumoral y comprende un agente quimioterapéutico o un anticuerpo monoclonal anti tumoral como se describe aquí. En una realización preferida adicional, el agente terapéutico anti tumoral comprende un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en trastuzumab, cetumiximab, petuzumab, Apomab, conatumumab, lexatumumab, bevacizumab, bevacizumab, denosumab, zanolimumab, lintuzumab, edrecolomab, rituximab, ticilimumab, tositumomab, alemtuzumab, epratuzumab, mitumomab, gemtuzumab ozogamicina, oregovomab, pemtumomab daclizumab, panitumumab, catumaxomab, ofatumumab, y ibritumomab.

El vehículo farmacéuticamente aceptable es no tóxico, biocompatible y se selecciona de manera que no afecte perjudicialmente a la actividad biológica de los multímeros (y cualquier otro agente terapéutico combinado con los mismos). Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables para péptidos se describen en el documento de Patente U.S. No. 5,211,657 de Yamada. Las composiciones pueden formularse en preparaciones en formas sólida, semi-sólida, gel, líquido o gaseosa tales como tabletas, cápsulas, polvos, gránulos, ungüentos, soluciones, supositorios, inhalantes, e inyecciones, que permiten la administración oral, parenteral, o quirúrgica. Vehículos adecuados para administración parenteral mediante inyección, infusión, o irrigación y administración tópica incluyen agua destilada, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, soluciones de Ringer normales o lactadas, solución de dextrosa, solución de Hank, o propanodiol. Además, pueden emplearse aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este propósito puede emplearse cualquier aceite biocompatible incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos, tales como ácido oleico, encuentran uso en la preparación de inyectables. El vehículo y agente pueden estar compuestos como un líquido, suspensión, gel polimerizable o no polimerizable, pasta o pomada. El vehículo puede comprender también un vehículo de suministro para sostener (es decir, extender, retrasar o regular) el suministro del agente (s) o para mejora la administración, absorción, estabilidad, o farmacocinética del agente (s) terapéutico. Dicho vehículo de suministro puede incluir, a modo de ejemplo no limitante, micropartículas, microesferas, nonoesferas, o nanopartículas compuestas de proteínas, liposomas, carbohidratos, compuestos orgánicos sintéticos, compuestos inorgánicos, hidrogeles poliméricos o copoliméricos, y micelas poliméricas. Los sistemas de suministro de hidrogeles y micelas adecuados incluyen los copolímeros PEO:PHB:PEO y complejos copolímero/ciclodextrina descritos en el documento de Publicación Internacional No. WO 2004/009664 A2, y el PEO y complejos PEO/ciclodextrina descritos en el documento de Patente U.S. No. 2002/0019369 A1. Tales hidrogeles se pueden inyectar localmente en el sitio de la acción deseada, o de forma subcutánea o intramuscular para formar un depósito de liberación sostenida.

Para administración intratecal (IT) o intracerebroventricular (ICV), se pueden utilizar sistemas de administración adecuadamente estériles (por ejemplo, líquidos; geles, suspensiones, etc.) para administrar las composiciones. Para administración oral de agentes no peptidérgicos, las composiciones pueden llevar un relleno o diluyente inerte tal como sacarosa, almidón de maíz, o celulosa.

Las composiciones de la presente invención pueden incluir también excipientes biocompatibles, tales como agentes de dispersión o humectantes, agentes de suspensión, diluyentes, tampones, potenciadores de penetración, emulsionantes, aglutinantes, espesantes y agentes aromatizantes (para administración oral). Las formulaciones ejemplares pueden administrarse parenteralmente como dosis inyectables de una solución o suspensión del multímero en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como agua, aceites, solución salina, glicerol, o etanol.

Además, sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias tamponadoras de pH y similares pueden estar presentes en composiciones que comprenden polipéptidos modificados. Componentes adicionales de composiciones farmacéuticas incluyen petróleo (tales como de animal, vegetal, o de origen sintético), por ejemplo, aceite de soja y aceite mineral. En general, glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol son vehículos líquidos preferidos para las soluciones inyectables.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse también en forma de inyección de depósito o preparación de implante que se pueden formular de tal manera que permitan una liberación sostenida o pulsátil de los multímeros y otros agentes terapéuticos (si están presentes).

La composición farmacéutica puede comprender además del polipéptido de la invención (a) un lioprotector; (b) un tensoactivo; (c) un agente espesante; (d) un agente de ajuste de la tonicidad; (e) un estabilizante; (f) un conservante y/o (g) un tampón. En algunas realizaciones, el tampón en la composición farmacéutica es un tampón Tris, un tampón histidina, un tampón fosfato, un tampón citrato o un tampón acetato. La composición farmacéutica puede incluir también un lioprotector, por ejemplo, sacarosa, sorbitol o trehalosa. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica incluye un conservante por ejemplo cloruro de benzalconio, bencetonio, clorohexidina, fenol, m-cresol, alcohol bencílico, metilparaben, propilparaben, clorobutanol, o-cresol, p-cresol, clorocresol, nitrato fenilmercúrico, timerosal, ácido benzoico, y varias mezclas de los mismos. En otras realizaciones, la composición farmacéutica incluye un agente espesante, como glicina. En otras realizaciones, la composición farmacéutica incluye un tensoactivo por ejemplo, polisorbato-20, polisorbato-40, polisorbato-60, polisorbato-65, polisorbato-80, polisorbato-85, poloxamer-188, monolaurato de sorbitan, monopalmitato de sorbitan, monoestearato de sorbitan, monooleato de sorbitan, trilaurato de sorbitan, triestearato de sorbitan, trioleato de sorbitan, o combinaciones de los mismos. La composición farmacéutica puede incluir también un agente de ajuste de la tonicidad, por ejemplo, un compuesto que hace que la formulación sea sustancialmente isotónica o isoosmótica con la sangre humana. Ejemplos de agentes de ajuste de la tonicidad incluyen sacarosa, sorbitol, glicina, metionina, manitol, destrosa, inositol, cloruro de sodio, arginina y clorhidrato de arginina. En otras realizaciones, la composición farmacéutica incluye adicionalmente un estabilizante, por ejemplo, una molécula que, cuando se combina con una proteína de interés previene o reduce sustancialmente la inestabilidad química y/o física de la proteína de interés en forma liofilizada o líquida. Estabilizantes ejemplares incluyen sacarosa, sorbitol, glicina, inositol, cloruro de sodio, metionina, arginina, y clorhidrato de arginina.

La composición farmacéutica puede envasarse en cualquier manera adecuada. En una realización, la composición farmacéutica se envasa como un kit que contiene un recipiente (tal como un vial) del multímero de fibra AdB-2/3. En una realización preferida, el kit comprende además, en el mismo recipiente o un recipiente separado (tal como un vial), un agente terapéutico, un agente de diagnóstico, o un agente de formación de imagen para administrar a un sujeto, junto con el multímero de fibra AdB-2/3.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona kits que comprenden (a) uno o más polipéptidos recombinantes/multímeros de fibra AdB-2/3, ácidos nucleicos aislados, vectores de expresión recombinantes, y/o células huésped de la invención; y (b) instrucciones para su/sus usos para tratar un trastorno asociado con el tejido epitelial. Los kits pueden comprender además un agente terapéutico para utilizar en los métodos de la presente invención.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona métodos para mejorar el tratamiento terapéutico, o el diagnóstico de un trastorno asociado con el tejido epitelial, y/o formación de imágenes de tejidos epiteliales, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite:

una cantidad de uno o más agentes terapéuticos suficiente para tratar el trastorno, de diagnóstico suficiente para diagnosticar el trastorno, y/o agente de formación de imágenes suficiente para formar imágenes del tejido epitelial; y

una cantidad del multímero de fibra AdB-2/3 de la invención, o una composición farmacéutica de la invención, suficiente para mejorar la eficacia de uno o más agentes terapéuticos, agentes de diagnóstico, y/o agentes de formación de imágenes.

Los métodos de este aspecto de la invención se pueden utilizar para mejorar el tratamiento terapéutico, el diagnóstico, o la formación de imágenes de un trastorno asociado con el tejido epitelial mejorando el acceso para el agente terapéutico, de diagnóstico, y/o de formación de imagen a su diana y diseminación en el tejido epitelial. Aunque no están limitados por ningún mecanismo, los inventores creen que esto ocurre a través mecanismos complementarios: movimiento del receptor de la diana desde la superficie celular basolateral a la apical permitiendo así un mejor acceso a del tejido epitelial diana por los agentes terapéuticos, de diagnóstico, y/o de formación de imágenes que se dirigen al receptor, (tales como anticuerpos monoclonales), y una mejor penetración del agente terapéutico mediante la ruptura de las uniones intercelulares. DSG2 es el principal receptor de alta afinidad para AdB-2/3. DSG2 es una glicoproteína de transmembrana de unión al calcio perteneciente a la familia de proteínas de cadherina. En células epiteliales, DSG2 es un componente de la estructura de adhesión célula-célula. Su cola citoplásmica interacciona con una serie de proteínas que están en contacto directo con los reguladores de la adhesión celular y las uniones intercelulares/morfología celular. Se ha demostrado que DSG2 está sobreexpresado

en unas series de neoplasias epiteliales que incluyen cáncer gástrico, carcinomas celulares escamosos, melanoma, cáncer de próstata metastático, y cáncer de vejiga.

Aunque no están limitados por un mecanismo de acción específico, los inventores creen que el multímero de fibra AcB-2/3 que se une a DSG2 sirve para desencadenar la apertura transitoria mediada por DSG2 de las uniones intercelulares, lo que sirve para mejorar el acceso de los agentes terapéuticos, de diagnóstico, de formación de imágenes, o cualquier otro compuesto de interés que se une a una diana en las células epiteliales que de otro modo estarían atrapadas al menos en cierta medida en uniones intercelulares. Ejemplos detallados de tal actividad se proporcionan aquí. Los métodos de la invención pueden por lo tanto llevarse a cabo utilizando cualquier multímero de fibra AdB-2/3 de la presente invención para activar la apertura transitoria mediada por DSG2 de las uniones intercelulares. Ejemplos de multímeros que comprenden uno o más multímeros de fibra AdB-2/3 de la invención que se pueden utilizar en estos métodos, incluyen, pero no se limitan a, viriones AdB-2/3, cápsides AdB-2/3, partículas dodecaédricas AdB-2/3 (PtDd) (partículas dodecaédricas subvirales producidas por AdB-2/3 durante su replicación), y multímeros de fibra AdB-2/3 recombinantes.

Los métodos de la invención tienen una amplia aplicación para la administración de cualquier agente terapéutico, de diagnóstico, de formación de imagen, u otro compuesto al tejido epitelial que comprende uniones intercelulares en las que el acceso a una diana de interés puede estar limitado, ya que DSG2 se expresa ampliamente en las células epiteliales. Como se utiliza aquí, un “trastorno asociado con el tejido epitelial” es cualquier trastorno en donde el agente terapéutico, de diagnóstico, o de formación de imágenes administrado a/a través de células epiteliales/tejido epitelial proporciona un beneficio clínico a un paciente, ya sea en la mejora de la eficacia del agente terapéutico, de diagnóstico y/o de formación de imágenes. Tales trastornos incluyen, pero no se limitan a, tumores sólidos (por ejemplo, cualquier tumor con uniones celulares epiteliales), trastornos gastrointestinales (incluyendo pero no limitado a síndrome de intestino irritable, trastorno inflamatorio del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, estreñimiento, enfermedad del reflujo gastroesofágico, esófago de Barrett, etc.), enfermedades de la piel (incluyendo pero no limitadas a psoriasis y dermatitis), trastornos pulmonares (incluyendo pero no limitados a enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, bronquitis, enfisema pulmonar, fibrosis quística, enfermedad pulmonar intersticial, neumonía, trastornos del conducto pancreático, trastornos cerebrales (es decir: cualquier trastorno cerebral que podría beneficiarse de un transporte mejorado de los fármacos a través de la barrera hematoencefálica), hipertensión pulmonar primaria, embolia pulmonar, sarcoidosis pulmonar, tuberculosis, etc.), trastornos renales, (incluyendo pero no limitados a glomerulonefritis), enfermedades hepáticas (incluyendo pero no limitadas a hepatitis), trastornos endocrinos (incluyendo pero no limitados a diabetes y trastornos del tiroides), trastornos del conducto pancreático (incluyendo pero no limitados a pancreatitis), y trastornos del conducto biliar (incluyendo pero no limitados a obstrucción del conducto biliar, colecistitis, coledocolitiasis, cálculos biliares, etc.) e infecciones de los tejidos epiteliales (incluyendo pero no limitado a celulitis, neumonía, hepatitis, y pielonefritis). En una realización preferida, el trastorno asociado con el tejido epitelial comprende un tumor sólido, que incluye pero no se limita a tumores de mama, tumores de pulmón, tumores de colon, tumores rectales, tumores de piel, tumores endocrinos, tumores de estómago, tumores de próstata, tumores de ovario, tumores uterinos, tumores cervicales, tumores renales, melanomas, tumores pancreáticos, tumores hepáticos, tumores cerebrales, tumores de cabeza y cuello, tumores nasofaríngeos, tumores gástricos, carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, tumores vesicales, y tumores esofágicos. Como comprenderán los expertos en la técnica, tales tumores incluyen tumores primarios, tumores que son localmente invasivos, así como tumores que han metastatizado.

Como se usa aquí, “mejorar la eficacia” significa cualquier aumento en la eficacia terapéutica, de diagnóstico, y/o de formación de imágenes sobre lo que se vería utilizando el agente terapéutico, de diagnóstico, y/o de formación de imágenes sólo. Por ejemplo, las mediciones de la eficacia terapéutica variarán dependiendo del trastorno que va a ser tratado, pero son fácilmente identificadas por un médico asistente. Por ejemplo, tales aumentos de eficacia incluyen, pero no se limitan a, el aumento de uno o más de los siguientes en relación con el tratamiento con solo el agente terapéutico: (a) reducir la gravedad del trastorno; (b) limitar o prevenir el desarrollo de síntomas característicos del trastorno (s) que está siendo tratado; (c) inhibir el empeoramiento de los síntomas característicos del trastorno (s) que se está tratando; (d) limitar o prevenir la reaparición del trastorno (s) en pacientes que han tenido anteriormente el trastorno (s); y (e) limitar o prevenir la reaparición de los síntomas en pacientes que anteriormente eran sintomáticos para el trastorno (s). En un ejemplo no limitante, el tratamiento de un tumor sólido proporciona una capacidad para inducir la salida de los receptores tumorales desde el lado basolateral de las células epiteliales para permitir un acceso mejorado y la muerte del tumor.

Para el cáncer, existen estándares para definir la respuesta tumoral y métodos estándar para medir la respuesta. Estos incluyen la respuesta tumoral, que se determina mediante la monitorización del cambio en el tamaño del tumor, o un marcador sérico de la enfermedad. Una respuesta parcial es más del 50% de reducción en el tumor, mientras que una respuesta completa se define como la completa desaparición del tumor. Los métodos utilizados para medir los tumores son bien conocidos por los médicos e incluyen examinación física, pruebas radiológicas tales como tomografía computarizada (CT scans), resonancia magnética (MRI), tomografías PET, rayos-X así como marcadores de suero tales como antígeno prostático específico, que se utiliza para controlar el cáncer de próstata. Otras medidas de la eficacia terapéutica del tratamiento del cáncer incluyen medidas del tiempo hasta la progresión, supervivencia libre de progresión y supervivencia total.

La eficacia de diagnóstico mejorada incluye cualquier mejora en la eficacia comparada con la administración del agente de diagnóstico sólo, incluyendo pero no limitado, al aumento de la especificidad y/o la sensibilidad de la prueba de diagnóstico. La eficacia de la formación de imágenes mejorada incluye cualquier mejora en la eficacia comparada con la administración del agente de formación de imágenes solo, incluyendo pero no limitado a especificidad, sensibilidad, reproducibilidad, mejora del contraste, detección de sitios más pequeños de enfermedad, delineación más precisa de la enfermedad, tal como tamaño y forma de las enfermedades, tal como tumores, abscesos, etc.

En varias realizaciones, el aumento en la eficacia es un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50%, 75%, 100%, o beneficio mayor en comparación con la eficacia con el agente terapéutico, de diagnóstico y/o de formación de imágenes solos en una población de pacientes.

Cualquier sujeto adecuado puede ser tratado utilizando los métodos de la invención, preferiblemente sujetos humanos.

Cualquier agente terapéutico, de diagnóstico, de formación de imágenes, u otro compuesto que pueda dirigirse al tejido epitelial y cuya liberación al tejido epitelial pueda mejorarse mediante la apertura transitoria de las uniones intercelulares puede utilizarse en los métodos de la invención. En una realización, el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos, inmunconjugados, nonopartículas, agentes terapéuticos de ácidos nucleicos, y combinaciones de los mismos, agentes quimioterapéuticos, vacunas, partículas radioactivas/terapia de radiación ("radiación"), inmunoterapia celular incluyendo terapia de células T adoptiva y terapia de células dendríticas (ejemplo: penetración intratumoral de células T administradas), agentes terapéuticos inhalados, construcciones de terapia génica (incluyendo pero no limitado al virus AdB-2/3 como vector de terapia génica y coadministración con un vector de terapia génica basado en Ad5), otros agentes terapéuticos de ácido nucleico, y combinaciones de los mismos.

En varias realizaciones, el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en agentes alquilantes, inhibidores de angiogénesis, anticuerpos, antimetabolitos, antimitóticos, antiproliferativos, inhibidores de Aurora quinasa, inhibidores de los promotores de apoptosis (por ejemplo, Bcl-xL, Bcl-w y Bfl-1), activadores de la vía del receptor de la muerte, inhibidores de quinasa Bcr-Abl, anticuerpos BITE (Bi-Specific Tcell Engager), modificadores de respuesta biológica, inhibidores de quinasa dependiente de ciclina, inhibidores del ciclo celular, inhibidores de ciclooxigenasa 2, inhibidores del factor de crecimiento, inhibidores de la proteína de choque térmico (HSP)-90, agentes de desmetilación, inhibidores de histona desacetilasa (HDAC), terapias hormonales, inmunológicos, inhibidores de proteínas de apoptosis (IAPs), antibióticos intercalantes, inhibidores de quinasa, diana mamífera de inhibidores de rapamicina, inhibidores de la quinasa regulada por la señal extracelular activada por mitógenos de microRNA, proteínas de unión multivalentes, fármacos anti inflamatorios no esteroideos (NSAIDs), inhibidores de poli ADP (adenosina difosfato)-ribosa polimerasa (PARP), agentes quimioterapéuticos de platino, inhibidores de quinasa tipo polo (Plk), inhibidores de proteasoma, análogos de purina, análogos de pirimidina, inhibidores del receptor de tirosina quinasa, alcaloides de plantas retinoides/deltoides, pequeños ácidos ribonucleicos inhibidores (siRNAs), inhibidores de topoisomerasas y similares.

Ejemplos de agentes terapéuticos que están dentro de estas diversas clases incluyen, pero no se limitan a: docetaxel, doxorubicina, irinotecan, paclitaxel (Taxol®), partículas ligadas a la albúmina del paclitaxel (Abraxane®), liposoma del clorhidrato de doxorubicina (Doxil®), anticuerpos BITE tales como adecatumumab (Micromet MT201), blinatumomab (Micromet MT103) y similares, agentes terapéuticos basados en siRNA, agentes alquilantes incluyendo altretamina, AMD-473, AP-5280, apaziquona, bendamustina, brostallicin, busulfán, carboquona, carmustina (BCNU), clorambucil, CLORETAZINE® (laromustina, VNP 40101M), ciclofosfamida, dacarbazina, decitabina, 5'-azatidina, estramustina, fotemustina, glufosfamida, ifosfamida, KW-2170, lomustina (CCNU), mafosfamida, melfalan, mitobronitol, mitolactol, nimustina, N-óxido mostaza de nitrógeno, ranimustina, temozolomida, tiotepa, TREANDA® (bendamustina), treosulfan, rofosfamida y similares; inhibidores de la angiogénesis que incluyen inhibidores de la tirosina quinasa del receptor endotelial específico (Tie-2), inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), inhibidores del receptor del factor de crecimiento de la insulina 2 (IGFR-2), inhibidores de la metaloproteína 2 de matriz (MMP-2), inhibidores de la metaloproteína 9 de matriz (MMP-9), inhibidores del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), análogos de trombospondina, inhibidores de tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) y similares; antimetabolitos incluyendo ALIMTA® (pemetrexado disódico, LY231514, MTA), 5-azacitidina, XELODA® (capecitabina), carmofur, LEUSTAT® (cladribina), clofarabina, citarabina, ocfosfato de citarabina, citosina arabinosido, decitabina, deferroxamina, doxifluridina, eflornitina, EICAR (5-etinil-1-β-D-ribofuranosilimidazol-4-carboxamida), enocitabina, etnilcitidina, fludarabina, 5-fluorouracilo sólo o en combinación con leucovorina, GEMZAR® (gemcitabina), hidroxiaurea, ALKERAN® (melfalan), mercaptopurina, 6-mercaptopurina, ribosida, metotrexato, análogos de metotrexato (tales como trimetrexato y pralatraxato), ácido micofenólico, nelarabina, nolatrexed, ocfosfato, pelitrexol, pentostatina, raltitrexed, ribavirina, triapina, trimetrexato, S-1, tiazofurina, tegafur, TS-1, vidarabina, y similares; inhibidores de la proteína bcl-2 incluyendo AT-101 ((-)-gospol), GENASENSE® (G3139 o oblimersen (oligonucleótido antisentido dirigido a Bcl-2)), IPI-194, IPI-565, N-(4-(4-((4'-cloro(1,1'-bifenil)-2-yl)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(dimetilamino)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-nitrobencenosulfonamida (ABT-737), N-(4-(4-((2-(4-fluorofenil)-5,5-dimetil-1-ciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(morfolin-4-il)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-((trifluorometil)sulfonil)bencenosulfonamida

(ABT-263), GX-070 (obatoclax) y similares; inhibidores de quinasa Bcr-Abl incluyen DASATINIB® (BMS-354825), GLEEVEC® (imatinib) y similares; inhibidores de CDK incluyendo AZD-5438, BMI-1040, BMS-032, BMS-387, CVT-2584, flavopiridol, GPC-286199, MCS-5A, PD-0332991, PHA-690509, seliciclib (CYC-202, R-roscovitina), ZK-304709 y similares; inhibidores de EGFR incluyendo ABX-EGF, inmunoliposomas anti-EGFR, vacuna EGF, EMD-7200, ERBITUX® (cetuximab), HR3, anticuerpos IgA, IRESSA® (gefitinib), TARCEVA® (erlotinib o OSI-774), TP-38, proteína de fusión EGFR, TYKERB® (lapatinib) y similares; inhibidores del receptor ErbB2 incluyen CP-724-714, CI-1033 (canertinib), HERCEPTIN® (trastuzumab), TYKERB® (lapatinib), OMNITARG® (2C4, petuzumab), TAK-165, GW-572016 (ionafarnib), GW-282974, EKB-569, PI-166, dHER2 (vacuna HER2), APC-8024 (vacuna HER-2), anticuerpo biespecífico anti-HER/2neu, B7.her2lgG3, anticuerpos biespecífico trifuncional AS HER2, mAb AR-209, mAb 2B-1, y similares; inhibidores de histona desacetilasa incluyen romidepsina, LAQ-824, MS-275, trapoxina, ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA), TSA, ácido valproico y similares; inhibidores de HSP-90 incluyendo 17-AAG-nab, 17-AAG, CNF-101, CNF-1010, CNF-2024, 17-DMAG, geldanamicina, IPI-504, KOS-953, MYCOGRAB® (anticuerpo humano recombinante a HSP-90), NCS-683664, PU24FC1, PU-3, radicol, SNX-2112, STA-9090 VER49009 y similares; activadores de la vía del receptor de la muerte incluyendo TRAIL, anticuerpos y otros agentes que se dirigen a TRAIL o receptores de la muerte (por ejemplo, DR4 y DR5) tales como Apomab, conatumumab, ETR2-ST01, GDC0145, (lexatumumab), HGS-1029, LBY-135, PRO-1762 y trastuzumab; agentes quimioterapéuticos de platino incluyen cisplatino, ELOXATIN® (oxaliplatino) eptaplatino, lobaplatino, nedaplatino, PARAPLATIN® (carboplatino), satraplatino, picoplatino y similares; inhibidores de VEGFR incluyendo AVASTIN® (bevacizumab), ABT-869, AEE-788, axitinib (AG-13736), AZD-2171, CP-547,632, IM-862, MACUGEN (pegaptamib), NEXAVAR® (sorafenib, BAY43-9006), pazopanib (GW-786034), vatalanib (PTK-787, ZK-222584), SUTENT® (sunitinib, SU-11248), trampa de VEGF, ZACTIMATHi (vandetanib, ZD-6474) y similares; terapia celular dendrítica (sipulecel-T, Provenge®); inhibidores de topoisomerasa incluyendo aclarubicina, 9-aminocamptotecina, amonafide, amsacrina, becatecarina, belotecan, BN-80915, CAMPTOSAR® (clorhidrato de irinotecan), captotecina, dexrazoxina, diflomotecan, edotecarina, ELLENCE® o PHARMORUBICIN® (epirubicina), etoposide, exatecan, abraxane, irinotecan, 10-hidroxicamptotecina, gimatecan, lurtotecan, mitoxantrona, oratecina, pirarubicina, pixantrona, rubitecan, sobuzoxane, SN-38, tafluposida, topotecan y similares; anticuerpos incluyendo AVASTIN® (bevacizumab), anticuerpos específicos de CD40, chTNT-1/B, denosumab, ERBITUX® (cetuximab), HUMAX-CD4® (zanolimumab), anticuerpos específicos de IGF I R, lintuzumab, PANOREX® (edrecolomab), RENCAREX® (WX G250), RITUXAN (rituximab), ticilimumab, Trastuzimab y similares; terapia hormonal incluyendo ARIMIDEX® (anastrozol), AROMASIN® (exemestano), arzoxifeno, CASODEX® (bicalutamida), CETROTIDE® (cetorelix), degarelix, deslorelina, DESOPAN® (trilostano), dexametasona, DROGENIL® (flutamida), EVISTA® (raloxifeno), AFEMA® (fadrozol), FARESTON® (toremifeno), FASLODEX® (fulvestrant), FEMARA® (letrozol), formestano, glucocorticoides, HECTOROL® (doxercalciferol), RENAGEL® (carbonato de sevelamer), lasofoxifeno, acetato de leuprolida, MEGACE® (megesterol), MIFEPREX® (mifepristona), NILANDRON® (nilutamida), NOLVADEX® (citrate de tamoxifeno), PLENAXIS® (abarelix), prednisona, PROPECIA® (finasterida), rilostano, SUPREFACT® (buserelina), TRELSTAR® (hormonas liberadoras de hormonas luteinizantes (LHRH)), VANTAS® (implante de histrelina), VETORYL® (trilostano o modrastano), ZOLADEX® (fosrelina, goserelina) y similares; inmunológicos incluyendo interferón alfa, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón beta, interferón gamma-1a, ACTIMMUNE® (interferón gamma-1b) o interferón gamma-n1, combinaciones de los mismos y similares. Otros agentes incluyen ALFAFERONE® (1FN-alfa), BAM-002 (glutaciona oxidada), BEROMUN® (tasonermína), BEXXAR® (tositumomab), CAMPATH® (alemtuzumab), CTLA4 (antígeno linfocítico citotóxico 4), decarbazina, denileucina, epratuzumab, GRANOCYTE® (lenograstim), lentinan, interferón alfa de leucocitos, imiquimod, MDX-010 (anti-CTLA-4), vacuna de melanoma, mitumomab, molgramostim, MYLOTARG.TM. (gemtuzumab ozogamicina), NEUPOGEN® (filgrastim), Onco VAC-CL, OVAREX® (oregovomab), pentumomab (Y-muHMFG1), PROVENGE® (sipileucel-T), sargaramostim, sizofilan, teceleucina, THERACYS® (Bacillus Calmette-Guerin), ubenimex, VIRULIZIN® (agente inmunoterapéutico, Lorus Pharmaceuticals), Z-100 (Sustancia específica de Maruyama (SSM)), WF-10 (detraclorodecaóxido (TCDO)), PROLEUKIN® (aldesleucina), ZADAXIN® (timalfasin), ZENAPAX® (daclizumab), ZEVALIN®. (90Y-Ibritumomab tiuxetan) y similares; ofatumumab; agentes modificadores de respuesta biológica incluyendo krestina, lentinan, sizofurano, picibanil PF-3512676 (CpG-8954), ubenimex y similares; análogos de pirimidina incluyen citarabina (ara C o Arabinosido C), citosina arabinosido, doxifluridina, FLUDARA® (fludarabina), 5-FU (5-fluorouracilo), floxuridina, GEMZAR® (gemcitabina), TOMUDEX® (ratitrexed), TROXATYL® (triacetiluridina troxacitabina) y similares; análogos de purina incluyendo LANVIS® (tioguanina) y PURI-NETHOL® (mercaptapurina); agentes antimitóticos incluyendo batabulina, epotilona D (KOS-862), N-(2-((4-hidroxifenil)amino)piridin-3-il)-4-metoxibencenosulfonamida, ixabepilona (BMS 247550), paclitaxel, TAXOTERE® (docetaxel), PNU100940 (109881), patupilona, XRP-9881 (larotaxel), vinflunina, ZK-EPO (epotilona sintética) y similares; y otros agentes quimioterapéuticos tales como ABRAXANE® (ABI-007), ABT-100 (inhibidor de farnesil transferasa), ADVEXIN® (vacuna Ad5CMV-p53), ALTOCOR® o MEVACOR® (lovastatina), AMPLIGE®. (poli I:poli C12U, un RNA sintético), APTOSYN® (exisulind), AREDIA® (ácido pamidróico), arglabina, L-asparaginasa, atamestrane (1-metil-3,17-diona-androsta-1,4-dieno), AVAGE® (tazaroteno), AVE-8062 (derivado de combrestatina) BEC2 (mitumomab), cachectina o cachexina (factor de necrosis tumoral), canvaxina (vacuna), CEAVAC® (vacuna contra el cáncer), CELEUK® (celmoleucina), CEPLENE® (diclorhidrato de histamina), CERVARIX® (vacuna contra el papilovirus humano), CHOP® (C: CYTOXAN® (ciclofosfamida); H: ADRIAMYCIN® (hidroxidoxorubicina); O: Vincristina (ONCOVIN®); P: prednisona), CYPAT® (acetato de ciporterona), combrestatina A4P, DAB(389)EGF (dominios catalíticos y de translocación de la toxina difteria fusionada mediante un ligador His-Ala al factor de crecimiento epidérmico humano) o TransMID-107R® (toxinas diftericas), dacarbazina, dactinomicina, ácido 5,6-dimetilxantenona-4-acético (DMXAA), eniluracilo, EVIZON.TM. (lactato de escualamina), DIMERICINE®

(loción liposomal T4N5), discodermolida, DX-8951f (mesilato de exatecan), enzastaurina, EPO906 (epitilona B), GARDASIL® (vacuna contra el papilomavirus humano cuadrivalente recombinante (tipos 6, 11, 16, 18), GASTRIMMUNE®, GENASENSE®, GMK (vacuna conjugada con gangliósidos), GVAX® (vacuna contra el cáncer de próstata), halofuginona, histerelina, hidroxycarbamida, ácido ibandronico, IGN-101, IL-13-PE38, IL-13-PE38QQR (cintredekin besudotox), IL-13-pseudomonas exotoxina, interferón-alfa., interferón-gamma., JUNOVAN® o MEPACT® (mifamurtide), lonafarnib, 5,10-metilentetrahidrofolato, miltefosina (hexadecilfosfolina), NEOVASTAT® (AE-941), NEUTREXIN® (trimetrexato glucuronato), NIPENT® (pentostatina), ONCONASE® (una enzima ribonucleasa), ONCOPHAGE® (tratamiento con vacuna de melanoma), ONCOVAX® (vacuna IL-2), ORATHECIN® (rubitecan), OSIDEM® (fármacos celulares basados en anticuerpos), OVAREX® MAb (anticuerpo monoclonal murino), paclitaxel, PANDIMEX® (saponinas de aglicona de ginseng que comprenden 20(S)protopanaxadiol (aPPD) y 20(S)protopanaxatriol (aPPT), panitumumab, PANVAC®-VF (vacuna de investigación contra el cáncer), pegaspargasa, PEG Interferón A, fenoxodiol, procarbazona, rebimastat, REMOVAB® (catumaxomab), REVLIMID® (lenalidomida), RSR13 (efaproxiral), SOMATULINE® LA (lanreotido), SORIATANE® (acitretina), estaurosporina (Streptomicina estaurosporas), talbostat (PT100), TARGRETIN® (bexaroteno), TAXOPREXIN® (DHA-paclitaxel), TELCYTA® (canfosfamida, TLK286), temilifeno, TEMODAR® (temozolomida), tesmilifeno, talidomida, THERATOPE® (STn-KLH), timitaq (clorhidrato de 2-amino-3,4-dihidro-6-metil-4-oxo-5-(4-piridiltio)quinazolina), TNFERADE® (adenovector: vehículo de DNA que contiene el gen para el factor-alfa. de la necrosis tumoral), TRACLEER® o ZAVESCA® (bosentan), tretinoina (Retin-A), tetrandrina, TRISENOX®. (tríoxido de arsénico), VIRULIZIN®, ukraina (derivado de alcaloides de plantas de celandina mayores), vitaxina (anticuerpo anti-alfavbeta3), XCYTRIN® (motexafina de gadolinio), XINLAY® (atrasentan), XYOTAX® (paclitaxel poliglumex), YONDELIS® (trabectedin), ZD-6126, ZINECARD® (desrazoxano), ZOMETA® (ácido zolendronico), crizotinib, zorubicina y similares.

En otra realización preferida, el agente terapéutico comprende un compuesto que se une a la desmogleina-2; preferiblemente un compuesto que se une a DSG2 y abre las uniones estrechas.

En otras realizaciones, el agente terapéutico comprende partículas radiactivas/terapia de radiación. Cualquier terapia o partícula radiactiva adecuada puede utilizarse según se considere adecuado por un médico asistente, incluyendo pero no limitado a cobalto-60, yodo-131, iridio-192, estroncio-89, samario-153, renio-186 y plomo-212.

En una realización preferida, el agente terapéutico es un agente terapéutico anti tumoral y comprende un agente quimioterapéutico o un anticuerpo monoclonal anti tumoral como se describe aquí. En una realización preferida adicional, el agente terapéutico antitumoral comprende un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en trastuzumab, cetumiximab, petuzumab, apomab, conatumumab, lexatumumab, bevacizumab, bevacizumab, denosumab, zanolimumab, lintuzumab, edrecolomab, rituximab, ticilimumab, tositumomab, alemtuzumab, epratuzumab, mitumomab, gemtuzumab ozogamicina, oregovomab, pentumomab daclizumab, panitumumab, catumaxomab, oftumumab, y ibritumomab. Ejemplos no limitantes de mAb anti tumoral útiles y sus usos específicos están listados en la Tabla 1 anterior, y se describen además en Campoli, M., y colaboradores, *Principles & Practice of Oncology* 23(1&2):1-19 (2009).

Los agentes terapéuticos de anticuerpos monoclonales pueden ser cualquier tipo de anticuerpo monoclonal, incluyendo pero no limitado a anticuerpos monoclonales estándar, monoclonales humanizados, anticuerpos totalmente humanos generados a partir de ratones u otras fuentes, monoclonales quiméricos, y fragmentos de los mismos. "Anticuerpos monoclonales humanizados" se refiere a anticuerpos monoclonales derivados de un anticuerpo monoclonal no humano, tal como un anticuerpo monoclonal de ratón. Alternativamente, anticuerpos monoclonales humanizados pueden derivarse de anticuerpos quiméricos que retienen, o retienen sustancialmente, las propiedades de unión al antígeno de los anticuerpos monoclonales parentales, no humanos, pero que presentan inmunogenicidad disminuida en comparación con el anticuerpo monoclonal parental cuando se administran a seres humanos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales quiméricos pueden comprender fragmentos de anticuerpo humano y murino, generalmente regiones variables humanas constantes y de ratones. Los anticuerpos monoclonales humanizados se pueden preparar utilizando una variedad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo pero no limitado a (1) regiones de determinación de la complementariedad de injerto de un anticuerpo monoclonal no humano sobre un marco humano y una región constante ("humanización") y (2) trasplantar los dominios variables de anticuerpos monoclonales no humanos, pero "encubriles" con una superficie de tipo humano mediante el reemplazo de residuos superficiales ("recubrimiento"). Estos métodos se describen, por ejemplo, en Jones y colaboradores *Nature* 321:522-525 (1986); Morrison y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 81:6851-6855 (1984); Morrison y Oi, *Adv. Immunol.* 44:65-92 (1988); Verhoeyer y colaboradores, *Science* 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immunol.* 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immunol.* 31(3):169-217 (1994); y Kettleborough, C.A. y colaboradores, *Protein Eng.* 4(7):773-83 (1991). Anticuerpos monoclonales se pueden fragmentar utilizando técnicas convencionales, y los fragmentos seleccionados para su utilidad de la misma manera que para anticuerpos enteros. Por ejemplo, los fragmentos F(ab')₂ pueden generarse por tratamiento del anticuerpo con pepsina. El fragmento resultante F(ab')₂ puede tratarse para reducir los puentes disulfuro para producir los fragmentos Fab'. Los fragmentos Fab pueden obtenerse por tratamiento de un anticuerpo IgG con papaína: los fragmentos F(ab') pueden obtenerse con digestión con pepsina del anticuerpo IgG. Un fragmento F(ab') puede producirse también uniendo el Fab' descrito a continuación mediante un enlace tioéter o un enlace disulfuro. Un fragmento Fab' es un fragmento de anticuerpo obtenido cortando un enlace disulfuro de la región bisagra del F(ab')₂. Un fragmento Fab' puede obtenerse por tratamiento de un fragmento F(ab')₂ con un agente reductor, tal como

ditiotreitol. Los péptidos del fragmento de anticuerpo se puede generar también por expresión de ácidos nucleicos que codifican tales péptidos en células recombinantes (véase, por ejemplo, Evans y colaboradores, J. Immunol. Meth. 184: 123-38 (1995)). Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una porción de un fragmento F(ab')₂ puede incluir secuencias de DNA que codifican el dominio CHI y la región de bisagra de la cadena H, seguido por un codón de terminación de traducción para producir dicha molécula de fragmento de anticuerpo truncado. Ejemplos no limitantes de fragmentos de anticuerpos monoclonales incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste esencialmente en los dominios VL, VH, CL, y CHI; (ii) los fragmentos F(ab)₂ y F(ab')₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro a la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste esencialmente en los dominios VH y CHI; (iv) un fragmento Fv que consiste esencialmente en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb (Ward y colaboradores, (1989) Nature 341:544-546), que consiste esencialmente en un dominio VH; y (vi) una o más CDRs aisladas o un paratopo funcional.

En una realización preferida que puede combinarse con cualquier realización o combinación de realizaciones de la invención, el trastorno comprende un tumor Her-2 positivo, y el método comprende la administración conjunta del multímero de fibra AdB-2/3 de la invención junto con terapia de anticuerpos monoclonales adecuada, solo o en combinación con un agente quimioterapéutico, radiación, o combinación de los mismos. En una realización preferida adicional, el anticuerpo monoclonal es trastuzumab. En una realización preferida adicional que puede combinarse con una cualquiera de estas realizaciones, el tumor Her-2 positivo se selecciona del grupo que consiste en un tumor de mama, un tumor gástrico, un tumor de colon, y un tumor de ovario. En una realización preferida adicional, el método se lleva a cabo en pacientes que no han respondido adecuadamente al trastuzumab, tal como por falta de remisión tumoral, por recaída tumoral o por desarrollo de resistencia al trastuzumab. Los métodos de estas realizaciones pueden utilizarse también para ayudar a reducir la dosisificación de trastuzumab necesaria para obtener la eficacia terapéutica, y pueden servir por tanto para limitar los efectos secundarios (tales como la cardiotoxicidad asociada al trastuzumab).

En otra realización preferida que se puede combinar con cualquier realización o combinación de realizaciones de la invención, el trastorno comprende un tumor EGFR positivo, y el método comprende la administración conjunta del multímero de fibra AdB-2/3 junto con la terapia de anticuerpo monoclonal adecuada, sólo o en combinación con un agente quimioterapéutico, radiación, o combinaciones de los mismos. En una realización preferida adicional, el anticuerpo monoclonal es cetuximab. En una realización preferida adicional que se puede combinar con una cualquiera de estas realizaciones, el tumor EGFR positivo se selecciona del grupo que consiste en un tumor de pulmón, un tumor de colon, un tumor de mama, un tumor rectal, un tumor de cabeza y cuello, y un tumor pancreático. En una realización preferida adicional, el método se lleva a cabo en pacientes que no han respondido adecuadamente a cetuximab, tal como por falta de remisión tumoral, por recaída tumoral, o por desarrollo de resistencia a cetuximab. Los métodos de estas realizaciones se pueden utilizar también para ayudar a reducir la dosisificación de cetuximab necesaria para obtener la eficacia terapéutica, y puede servir por tanto para limitar los efectos secundarios (tales como erupciones de tipo acné que ocurren a menudo durante la terapia con cetuximab).

En una realización preferida que puede combinarse con cualquier realización o combinación de realizaciones de la invención, el trastorno comprende un tumor epitelial, y el método comprende la administración conjunta del multímero de fibra AdB-2/3 junto con un inhibidor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), sólo o en combinación con otro agente quimioterapéutico, radiación, o combinaciones de los mismos. Puede utilizarse cualquier inhibidor de VEGF adecuado, incluyendo pero no limitado a bevacizumab.

En una realización adicional que puede combinarse con cualquier realización o combinación de realizaciones de la presente invención, los métodos que implican tumores sólidos comprenden además administrar un compuesto capaz de degradar proteínas de estroma tumoral. Se puede utilizar cualquier compuesto adecuado para degradar las proteínas de estroma tumoral, incluyendo pero no limitado a relaxina, collagenasa, tripsina, dispasa, MMP(metaloproteinas)-1, y MMP8. La administración de tales compuestos puede ser mediante un mecanismo adecuado, incluyendo terapia génica, administración separada con el multímero de fibra AdB-2/3 y el agente terapéutico, o administración como un conjugado con el multímero de fibra AdB-2/3 y el agente terapéutico.

En una realización adicional que puede combinarse con cualquier realización o combinación de realizaciones de la presente invención, los métodos comprenden además administrar el multímero de AdB-2/3 en combinación con otros abridores de unión. Como se usa aquí, un "abridor de unión" es un compuesto capaz de abrir transitoriamente las uniones intercelulares. Se puede utilizar cualquier abridor de uniones adecuado. En una realización no limitante, el abridor de uniones comprende la toxina Zona occludens (Zot), una toxina producida por *Vibrio cholerae* (V. cholerae) que posee la capacidad de alterar reversiblemente las uniones epiteliales intestinales, permitiendo el paso de macromoléculas a través de las barreras mucosas (Fasano y colaboradores, (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 88:5242-5246). Se ha desarrollado un hexapéptido derivado de Zot (AT-1001). En otra realización, la enterotoxina *Clostridium perfringens* elimina las claudinas -3 y -4 de las uniones estrechas para facilitar la invasión bacteriana (Sonoda N y colaboradores, (1999) J. Cell. Biol. 147:195-204). En una realización adicional, las oncoproteínas codificadas por Ad humano, HPV, HTLV-1 pueden abrir transitoriamente uniones epiteliales por localización errónea de la proteína de unión ZO-1 (Latorre IJ, y colaboradores, (2005) J. Cell. Sci. 118: 4283-4293). En otras realizaciones, varios virus humanos emplean uniones estrechas u otras moléculas de unión celular para lograr entrar en las células epiteliales. Entre estos virus están el virus de la hepatitis C (Evans, MJ, y colaboradores (2007) Nature

446: 801-805), reovirus (Barton ES, y colaboradores, (2001) Cell 104: 441-451), y virus del herpes simple (Geraghty RJ, y colaboradores, (1998) Science 280: 1618-1620).

En otra realización, el agente terapéutico es un agente terapéutico inhalado. Cualquier agente terapéutico inhalado adecuado puede utilizarse en los métodos de la invención. En varias realizaciones no limitante, el agente terapéutico inhalado se selecciona del grupo que consiste en corticosteroides, broncodilatadores, beta agonistas, anticolinérgicos, albuterol (PROVENTIL®; VENOLIN®; ACCUNEB®; PROAIR®) levalbuterol (XOPENEX®), pirbutrol (MAXAIR®), bromuro de ipratropio (ATROVENT®), beclometasona, budenosida, flunisolida (AEROBID®), fluticasona, triamcinolona acetona, fluticasona (un corticosteroide) y salmeterol (ADVAIR®), formoterol (un broncodilatador beta agonista de acción prolongada) y budesónida (un corticosteroide) (SYMICORT®), albuterol (un beta agonist), e ipratropio (COMBIVENT®, un anticolinérgico), budesónida (PULMICORT RESPULES®), y tiopropio (SPIRIVA®; un broncodilatador anticolinérgico).

En otra realización, el compuesto comprende un agente de diagnóstico o de formación de imagen. Los métodos de la invención tienen una amplia aplicación para la administración de cualquier agente de diagnóstico, de formación de imagen, u otro compuesto al tejido epitelial que comprende uniones intercelulares donde el acceso a una diana de interés puede estar limitado. En varias realizaciones no limitantes, los agentes de formación de imagen pueden incluir cualquier compuesto químico que pueda producir una señal detectable, directa o indirectamente. Muchos de dichos agentes de formación de imagen son conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos de agentes de formación de imagen adecuados para su uso en los métodos y composiciones descritas son isótopos radioactivos, moléculas fluorescentes, partículas magnéticas (incluyendo nanopartículas), partículas metálicas (incluyendo nanopartículas), moléculas fosforescentes, enzimas, anticuerpos, ligandos, y combinaciones de los mismos, mientras que los agentes de diagnóstico pueden comprender un compuesto que es un marcador de diagnóstico para un trastorno epitelial particular unido a dicho agente de formación de imagen. Los métodos para detectar y medir las señales generadas por los agentes de formación de imagen son conocidos también por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, los isótopos radiactivos se pueden detectar por conteo de centello o visualización directa; las moléculas fluorescentes se pueden detectar con espectrofotómetros fluorescentes; las moléculas fosforescentes se pueden detectar con un espectrofotómetro o visualizados directamente con una cámara; las enzimas se pueden detectar por detección o visualización del producto de una reacción catalizada por el enzima; los anticuerpos se pueden detectar detectando una etiqueta de detección secundaria acoplada al anticuerpo. En una realización preferida, el agente de formación de imagen y/o el agente de diagnóstico es uno que se puede utilizar para detectar un tumor, o por unión directa al tumor, o por acoplamiento del agente de formación de imagen o de diagnóstico con un compuesto que se puede unir al tumor.

En un ejemplo, los agentes de formación de imagen pueden comprender un agente de formación de imagen fluorescente, mientras que los agentes de diagnóstico pueden comprender un compuesto que es un marcador de diagnóstico para un trastorno epitelial particular unido al agente de formación de imagen fluorescente. Un agente de formación de imagen fluorescente es cualquier resto químico que tiene una señal de fluorescencia detectable. Este agente de formación de imagen se puede utilizar solo o en combinación con otros agentes de formación de imagen. Ejemplos de agentes fluorescentes adecuados que se pueden utilizar en las composiciones y métodos descritos aquí incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína (FITC), éster de 5-carboxifluoresceína-N-hidroxisuccinimida, 5,6-carboximetilfluoresceína, nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il (NBD), fluorescamina, OPA, NDA, colorante verde de indocianina, colorantes de cianina (por ejemplo, Cy3, Cy3,5, Cy5, Cy5,5 y Cy7), ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilben-2,2'-disulfónico, acridina, isotiocianato de acridina, ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS), 4-amino-N-(3-vinilsulfonil)fenilnaftalimida-3,5-disulfonato, N-(4-anilino-1-naftil)maleimida, antranilamida, BODIPY, amarillo brillante, cumarina, 7-amino-4-metilcumarina (AMC, Coumarin 120), 7-amino-4-trifluorometilcumarina (Coumaran 151), cianosina, 4',6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI), 5',5"-dibromopirogalol-sulfonaftaleina (Bromopirogalol rojo), 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarin, pentaacetato de dietilentriammina, ácido 4,4'-diisotiocianatodihidro-estilbeno-2,2'-disulfónico, ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico, cloruro de 5-[dimetilamino]naftaleno-1-sulfonilo (DNS, cloruro de dansilo), ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABCYL), 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC), eosina, isotiocianato de eosina, eritrosina B, eritrosina, isotiocianato, bromuro de etidio, etidio, 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazin-2-il)aminofluoresceína (DTAF), 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), isotiocianato de fluoresceína, IR144, IR1446, isotiocianato verde Malaquita, 4-metilumbeliferona, orto cresoltaleina, nitrotirosina, pararosanilina, rojo fenol, ficoeritrina B, o-ftaldialdehido, pireno, pireno butirato, succinimidil 1-pireno butirato, Reactivo rojo 4 (Cibacron[R] rojo brillante 3B-A), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxi-rodamina (R6G), cloruro de lisamina rodamina B sulfonilo rodamina (Rhod), 5,6-tetrametil rodamina, rodamina B, rodamina 123, rodamina X isotiocianato, sulforodamina B, sulforodamina 101, cloruro sulfonil derivado de sulforodamina 101 (rojo Texas), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxi-rodamina (TAMRA), tetrametilrodamina, isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC), riboflavina, ácido rosólico, cumarina-6, y similares, incluyendo combinaciones de los mismos. Estos restos de formación de imagen fluorescente se pueden obtener a partir de una variedad de fuentes comerciales incluyendo Molecular Probes, Eugene, Oreg. y Research Organics, Cleveland, Ohio, o pueden sintetizarse por los expertos en la técnica.

En otro ejemplo, los agentes de formación de imagen pueden comprender un agente de formación de imagen por resonancia magnética (MRI), mientras que los agentes de diagnóstico pueden comprender un compuesto que es un marcador de diagnóstico para un trastorno epitelial particular unido a un agente MRI. Un agente MRI es cualquier

resto químico que tiene una señal de resonancia magnética detectable o que pueden influir (por ejemplo, aumentar o cambiar) la señal de resonancia magnética de otro agente. Este tipo de agente de formación de imagen se puede utilizar solo o en combinación con otro agente de formación de imagen. En otro ejemplo más, un agente MRI basado en gadolinio puede servir como un agente de formación de imagen. Un ejemplo de agente MRI adecuado que se puede incorporar en los agentes de formación de imagen descritos es el ácido para-amino-fenil dietilentriaminopentaacético (p-NH₂-Bz-DTPA, Compuesto 7), una forma conjugable del ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), que es conocido por su fuerte unión al gadolinio y está aprobado para su uso clínico como agente de contraste de resonancia magnética. La incorporación de un agente MRI en una macromolécula grande tal como un sustrato dendrimérico como se describe aquí puede permitir una relajación de T1 grande (alto contraste) y múltiples copias del agente en una sola molécula, lo que puede aumentar la señal. Mediante la combinación de un agente de formación de imagen y, por ejemplo, un agente de formación de imagen fluorescente, el agente resultante se puede detectar, visualizar, y seguir en tiempo real mediante MRI. Otros agentes de formación de imagen incluyen agentes PET que pueden prepararse incorporando un ¹⁸F o un quelante para ⁶⁴Cu o ⁶⁸Ga. Además, la adición de un radionúclido puede utilizarse para facilitar la formación de imagen SPECT o administración de una dosis de radiación, mientras que los agentes de diagnóstico pueden comprender un compuesto que es un marcador de diagnóstico para un trastorno epitelial particular unido al agente PET.

En algunas realizaciones, el agente de diagnóstico es un agente de formación de imagen de diagnóstico, que incluye pero no se limita a agentes de tomografía de emisión de posición (PET), agentes de tomografía computarizada (CT), agentes de formación de imágenes de resonancia magnética (MRI), agentes de formación de imágenes magnética nuclear (NMI), agentes de fluoroscopia y agentes de contraste de ultrasonidos. Tales agentes de diagnóstico incluyen radioisótopos de dichos elementos como yodo (I), incluyendo ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I, etc., bario (Ba), gadolinio (Gd), tecnecio (Tc), incluyendo ⁹⁹Tc, fósforo (P), incluyendo ³¹P, hierro (Fe), manganeso (Mn), talio (Tl), cromo (Cr), incluyendo ⁵¹Cr, carbono (C), incluyendo ¹⁴C, o similares, compuestos marcados fluorescentemente, o sus complejos, quelatos, aductos y conjugados. Cualquier agente PET adecuado se puede utilizar, incluyendo pero no limitado a carbono-11, nitrógeno-13, oxígeno-15, fluor-18, 11C-metomidato, y análogos de glucosa de los mismos, incluyendo pero no limitado a fludeoxiglucosa (un análogo de glucosa marcado con fluor-18).

En otras realizaciones, el agente de diagnóstico es un gen marcador que codifica proteínas que son fácilmente detectables cuando se expresan en una célula (incluyendo, pero no limitado a, beta-galactosinasa, proteína fluorescente verde, luciferasa, y similares) y sondas de ácido nucleico marcadas (por ejemplo, sondas radiomarcadas o marcadas fluorescentemente). En algunas realizaciones, la conjugación covalente de agentes de diagnóstico a los multímeros de AdB-2/3 proporcionados aquí se consigue de acuerdo con una variedad de procesos de conjugación. En otras realizaciones, el agente de diagnóstico no está covalentemente asociado con los multímeros de AdB-2/3 proporcionados.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona métodos para mejorar la administración de una sustancia a un tejido epitelial, que comprende poner en contacto el tejido epitelial con (a) uno o más compuestos para administrarse al tejido epitelial; y (b) una cantidad de un multímero de fibra AdB-2/3 de la invención suficiente para mejorar el suministro de uno o más compuestos al tejido epitelial. En este aspecto, los compuestos pueden ser cualquier compuesto adecuado tal como los descritos en detalle anteriormente. En una realización preferida, el uno o más compuestos comprenden un agente de formación de imagen. En una realización preferida adicional el tejido epitelial comprende un tumor sólido, incluyendo cualquiera de los descritos en la presente solicitud. En varias realizaciones no limitantes, el tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en tumores de mama, tumores de pulmón, tumores de colon, tumores rectales, tumores de estómago, tumores de próstata, tumores de ovario, tumores uterinos, tumores de piel, tumores endocrinos, tumores cervicales, tumores de riñón, melanomas, tumores pancreáticos, tumores hepáticos, tumores cerebrales, tumores de cabeza y cuello, tumores nasofaríngeos, tumores gástricos, carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, tumores vesicales, y tumores esofágicos. Ejemplos de multímeros que comprenden uno o más multímeros de fibra AdB-2/3 de la invención que se pueden utilizar en estos métodos incluyen, pero no se limitan a, viriones AdB-2/3, cápsides AdB-2/3, partículas dodecaédricas AdB-2/3 (PtDd) (partículas dodecaédricas subvirales producidas por AdB-2/3 durante su replicación), y multímeros de fibras AdB-2/3 recombinantes.

En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona métodos para mejorar la administración de una sustancia de células o tejidos que expresan desmogleina 2 (DSG2), que comprenden poner en contacto la célula o tejido que expresa DSG2 con (a) uno o más compuestos para ser suministrados a la célula o tejido; y (b) una cantidad de un multímero de fibra AdB-2/3 de la invención suficiente para mejorar el suministro de uno o más compuestos al tejido. Ejemplos de tipos de tejidos que expresan DSG2 incluyen, pero no se limitan a, células/tejido epitelial (tal como aquellos descritos aquí), plaquetas humanas y granulocitos. Como se muestra en los ejemplos que siguen, DSG2 también actúa como un receptor en células no polarizadas. Por lo tanto, estos métodos encuentran aplicación no solo en células y tejido epitelial, sino que también son relevantes, por ejemplo, en patogénesis de AdB-2/3 y la aplicación intravascular de vectores AdB-2/3 para propósitos de terapia génica. Ejemplos de multímeros que comprenden uno o más multímeros de fibra AdB-2/3 de la invención que pueden utilizarse en estos métodos incluyen, pero no se limitan a, viriones AdB-2/3, cápsides AdB-2/3, partículas dodecaédricas AdB-2/3 (PtDd) (partículas dodecaédricas subvirales producidas por AdB-2/3 durante su replicación), y multímeros de fibra AdB-2/3 recombinantes.

En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona métodos para inducir una transición epitelial a mesenquimal (EMT) en un tejido, que comprende poner en contacto el tejido epitelial con una cantidad de un multímero de fibra AdB-2/3 de la invención suficiente para inducir EMT. EMT es un programa de transdiferenciación celular donde las células epiteliales pierden características tales como uniones intercelulares y las propiedades de ganancia de las células mesenquimales. EMT se caracteriza por un aumento de la expresión de los marcadores mesenquimales, un aumento de la expresión de los compuestos de la matriz extracelular, una disminución de la expresión de los marcadores epiteliales, una alteración de la ubicación de los factores de transcripción, y una activación de quinasas, y disociación de las uniones intercelulares. Ejemplos de multímeros que comprenden uno o más multímeros de fibra AdB-2/3 de la invención que pueden utilizarse en estos métodos incluyen, pero no se limitan a, viriones AdB-2/3, cápsides AdB-2/3, partículas dodecaédricas AdB-2/3 (PtDd) (partículas dodecaédricas subvirales producidas por AdB-2/3 durante su replicación), y multímeros de fibra AdB-2/3 recombinantes.

En todos los aspectos y realizaciones de los métodos de la invención, el agente terapéutico, de diagnóstico, y/o de formación de imagen pueden administrarse junto con el multímero de AdB-2/3 (tal como mediante las composiciones de la invención descritas anteriormente) o se pueden administrar por separado. En una realización, el agente terapéutico y el multímero de AdB-2/3 están unidos, mediante cualquier enlace covalente o no covalente adecuado. En una realización no limitante, un multímero de AdB-2/3 puede unirse a una toxina u otro fármaco para matar las células tumorales sólidas.

El multímero de fibra AdB-2/3 y/o el agente terapéutico se puede administrar en cualquier forma que se considere adecuada por un médico de cabecera, dependiendo de si un modo de administración local o sistémico es el más apropiado para la afección que se está tratando. Como se usa aquí, los términos "suministro sistémico" y "administración sistémica" pretenden incluir, pero no limitarse a, vías orales y parenterales incluyendo intramuscular (IM), subcutáneas, intravenosas (IV), intra arterial, inhalatoria, sublingual, bucal, tópica, transdermal, nasal, rectal, vaginal, y otras vías de administración que produzcan efectivamente la dispersión del agente administrado a un único o múltiples sitios de acción terapéutica deseada. Vías preferidas de administración sistemática para las presentes composiciones incluyen intravenosa, intramuscular, subcutáneas, e inhalatoria. En una realización preferida, se utiliza la administración intravenosa, tal como para el tratamiento de tumores diseminados (y para el suministro de anticuerpos monoclonales). En otra realización, la administración oral puede ser preferida, por ejemplo, para tratar trastornos epiteliales gastrointestinales (GI). En otra realización, la administración nasal o en aerosol puede ser preferida para su administración a los pulmones, tal como para trastornos epiteliales pulmonares.

El multímero de fibra AdB-2/3 se puede introducir en asociación con otra molécula, tal como un lípido o liposoma para proteger los polipéptidos de la degradación enzimática. Por ejemplo, se ha utilizado la unión covalente de polímeros, especialmente polietilenglicol (PEG), para proteger ciertas proteínas de la hidrólisis enzimática en el cuerpo y así prolongar la semivida.

El multímero de fibra AdB-2/3 y/o el agente terapéutico se pueden administrar sistemáticamente de forma periódica a intervalos determinados para mantener un nivel deseado de efecto terapéutico. Por ejemplo, la administración por inyección intravenosa puede ser una vez por día, una vez por semana, cada dos o cuatro semanas o a intervalos menos frecuentes. El régimen de dosificación será determinado por el médico considerando varios factores que pueden influir en la acción de la combinación de agentes. Estos factores incluirán el grado de progreso de la afección que se está tratando, la edad del paciente, sexo y peso, y otros factores clínicos. La dosificación para el multímero de fibra AdB-2/3 y/o agente terapéutico variará en función del multímero y/o agente terapéutico que se esté administrando, así como la presencia y naturaleza de cualquier vehículo de administración del fármaco (por ejemplo, un vehículo de administración de liberación sostenida). Además, la cantidad de dosificación se puede ajustar para tener en cuenta la variación en la frecuencia de administración y el comportamiento farmacocinético del agente (s) administrado. Los intervalos de dosificación de multímeros de fibra AdB-2/3 oscilarán generalmente entre 0,01 y 250 mg/kg, preferiblemente entre 0,1 y 10 mg/kg, y más preferiblemente entre 0,10 y 0,5 mg/kg. Las dosificaciones de agentes terapéuticos aprobadas son fácilmente identificables por los médicos. El agente terapéutico puede también poder administrarse a una dosificación reducida debido a una penetración mejorada en tejidos epiteliales, tales como cánceres.

El multímero de fibras AdB-2/3 puede administrarse a un sujeto antes, simultáneamente, o después de la administración del agente terapéutico. En una realización preferida, la administración del agente terapéutico y el multímero de fibras AdB-2/3 se puede llevar a cabo al mismo tiempo. La sincronización de las administraciones del agente terapéutico con respecto al multímero de fibras AdB-2/3 puede variar para conseguir el mayor efecto terapéutico. Preferiblemente, el agente terapéutico se administra en un momento para asegurar su contacto con la apertura transitoria de la unión intercelular causada por la unión del multímero de fibra AdB-2/3 a DSG2. Por ejemplo, el agente terapéutico se puede administrar antes, simultáneamente con, después de cada administración del multímero de fibra AdB-2/3. En otras realizaciones preferidas, el agente terapéutico se puede administrar después de la administración del multímero de fibra AdB-2/3, 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 después de la administración del multímero de fibra AdB-2/3.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar un trastorno asociado con el tejido epitelial, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad de un multímero de fibra AdB-2/3 de la invención suficiente para tratar el trastorno. En esta realización, no se suministra ningún otro agente terapéutico. En realizaciones no limitantes, la monoterapia se utiliza para tratar un trastorno seleccionado del grupo que consiste en una infección viral AdB-2/3, un tumor sólido, o un trastorno que se puede tratar utilizando un vector génico de suministro basado en AdB-2/3. Por ejemplo, en el tratamiento de tumores sólidos, el método comprende mejorar el acceso de células del sistema inmune al sitio del trastorno, tal como por penetración (tal como penetración intratumoral de células asesinas naturales preexistentes, células T o células dendríticas). El método puede utilizarse también para tratar cualquiera de los trastornos asociados con las células epiteliales discutidas anteriormente que pueden beneficiarse del mejor acceso de células del sistema inmune a las células epiteliales diana. En una realización preferida, el trastorno es un tumor sólido, y el método comprende mejorar el ataque del sistema inmune del tumor. El método puede utilizarse con cualquiera de los tumores sólidos discutidos anteriormente. Todas las realizaciones y combinaciones de realizaciones del primer aspecto de la invención pueden utilizarse también en este segundo aspecto, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Ejemplos de multímeros que comprenden uno o más multímeros de fibra AdB-2/3 de la invención que pueden utilizarse en estos métodos incluyen, pero no se limitan a, viriones AdB-2/3, cápsides AdB-2/3, partículas dodecaédricas AdB-2/3 (PtDd) (partículas dodecaédricas subvirales producidas por AdB-2/3 durante su replicación), y multímeros de fibra AdB-2/3 recombinantes.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar compuestos candidato para uno o más de los tratamientos de un trastorno asociado con el tejido epitelial, mejorar el suministro de una sustancia al tejido epitelial, mejorar la administración de una sustancia al tejido que expresa DSG2, inducir un EMT en un tejido, y/o tratar una infección AdB-2/3 que comprende (a) poner en contacto un multímero de fibra AdB-2/3 de la invención con DSG2 bajo condiciones para promover la unión del multímero a DSG2, en donde el contacto se lleva a cabo en presencia de uno o más compuestos de ensayo; y (b) identificar compuestos de ensayo positivo que compitan con el multímero de fibra AdB-2/3 para la unión a DSG2 comparado con el control; en donde los compuestos de ensayo positivo son compuestos candidatos para uno o más de los tratamientos de un trastorno asociado con el tejido epitelial, mejorando la administración de una sustancia a un tejido epitelial, para mejorar el suministro de una sustancia que expresa DSG2, inducir un EMT en un tejido, y/o tratar una infección AdB-2/3.

Los compuestos de ensayo positivo que compiten con el multímero de fibra AdB-2/3 para la unión a DSG2 son compuestos candidato para abrir transitoriamente las uniones intracelulares mediante su interacción con DSG2. Los ensayos de seguimiento para verificar la capacidad de los compuestos para abrir transitoriamente las uniones intracelulares mediante su interacción con DSG2 se puede llevar a cabo por cualquier método adecuado, incluyendo pero no limitado a los estudios descritos en los siguientes ejemplos. Los compuestos así identificados para tratar un trastorno asociado con el tejido epitelial, mejorar el suministro de una sustancia al tejido epitelial, mejorar el suministro de una sustancia que expresa DSG2, o inducir un EMT en un tejido, pueden utilizarse como sustitutos para el multímero de AdB-2/3 en cualquiera de los métodos de la presente invención. Además, los AdB-2/3 representan patógenos humanos importantes que causan infecciones del tracto respiratorio (algunas severas) y fiebre faringoconjuntival. Por lo tanto los compuestos que pueden tratar infección por AdB-2/3 serían útiles. Como se describe aquí, DSG2 como receptor primario de alta afinidad utilizado por AdB-2/3, y por lo tanto los compuestos que pueden disminuir la unión de AdB-2/3 a DSG2 son compuestos candidatos para tratar o limitar el desarrollo de la infección AdB-2/3.

Ejemplos de multímeros que comprenden uno o más multímeros de fibra AdB-2/3 de la invención que se pueden utilizar en estos métodos incluyen, pero no se limitan a viriones AdB-2/3, cápsides AdB-2/3, partículas dodecaédricas AdB-2/3 (PtDd) (partículas dodecaédricas subvirales producidas por AdB-2/3 durante su replicación), y multímeros de fibra AdB-2/3 recombinantes. Se puede utilizar cualquier control adecuado, incluyendo pero no limitado a un multímero AdB-2/3 unido a DSG2 en ausencia de compuestos de ensayo.

En una realización, el DSG comprende DSG2 recombinante. En otra realización, los métodos utilizan células que expresan DSG2 (endógena o recombinantemente) en la superficie celular.

En una realización no limitante, pueden utilizarse estudios de resonancia de plasmón superficial (SPR) utilizando sensores que contienen DSG2 recombinante inmovilizado para identificar compuestos candidato que unen el multímero de fibra AdB-2/3 a DSG2, combinado con estudios de competición DSG2. En otra realización, la identificación comprende estudios de trasducción, en los que la capacidad de los compuestos de ensayo para disminuir la unión se detecta como una disminución en la capacidad de viriones AdB-2/3 funcionales para transducir las células epiteliales que expresan DSG2. En otra realización, el extracto celular que expresa DSG2 se separa electroforéticamente y se transfiere por Western, y el multímero de fibra AdB-2/3 marcado se utiliza como sonda en la transferencia de Western en presencia de los compuestos de ensayo. En una realización adicional, se puede utilizar ensayos de transferencia de puntos, tales como los descritos en Wang y colaboradores, J. Virology (2007) 81:12785-12792; y Wang y colaboradores, (2008) 82:10567-10579.

Cuando los compuestos de ensayo comprenden secuencias polipeptídicas, tales polipéptidos pueden ser sintetizados químicamente o recombinantemente expresados. La expresión recombinante se puede lograr utilizando métodos estándar en la técnica, como se describió anteriormente. Tales vectores de expresión pueden comprender

vectores de expresión bacterianos o virales, y tales células huésped pueden ser procarióticas o eucarióticas. Los polipéptidos sintéticos, preparados utilizando técnicas bien conocidas de fase sólida, fase líquida, o técnicas de condensación peptídica, o cualquier combinación de las mismas, pueden incluir aminoácidos naturales y no naturales. Los aminoácidos utilizados para síntesis de péptidos pueden ser una resina del Boc (N α -amino protegido N α -t-butiloxycarbonil) aminoácido con protocolos estándares de desprotección, neutralización, acoplamiento y lavado, o la base estándar lábil del N α -aminoácido protegido 9-fluorenilmetoxycarbonil (Fmoc) aminoácidos. Ambos aminoácidos Fmoc y Boc N α -amino protegidos pueden obtenerse de Sigma, Cambridge Research Biochemical, u otras compañías químicas familiares para los expertos en la técnica. Además, los polipéptidos se pueden sintetizar con otros grupos N α -protectores que son familiares para los expertos en la técnica. La síntesis de péptidos en fase sólida puede llevarse a cabo por técnicas familiares para los expertos en la técnica y proporcionadas, tal como utilizando sintetizadores automatizados.

Cuando los compuestos de ensayo comprenden anticuerpos, tales anticuerpos pueden ser policlonales y monoclonales. Los anticuerpos pueden ser humanizados, totalmente humanos, o formas murinas de los anticuerpos. Tales anticuerpos pueden hacerse por métodos bien conocidos, tales como los descritos en Harlow y Lane, Antibodies; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988).

Cuando los compuestos de ensayo comprenden secuencias de ácido nucleico, tales ácidos nucleicos pueden sintetizarse químicamente o expresarse de forma recombinante también. Las técnicas de expresión recombinante son bien conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, y colaboradores, 1989, *supra*). Los ácidos nucleicos pueden ser DNA o RNA, y pueden ser monocatenarios o de doble cadena. Similarmente, tales ácidos nucleicos pueden sintetizarse químicamente o enzimáticamente por reacciones manuales o automatizadas, utilizando técnicas estándar en la técnica. Si se sintetiza químicamente o mediante síntesis enzimática *in vitro*, el ácido nucleico se puede purificar antes de su introducción en la célula. Por ejemplo, los ácidos nucleicos se pueden purificar de una mezcla por extracción con un disolvente o resina, precipitación, electroforesis, cromatografía, o una combinación de las mismas. Alternativamente, los ácidos nucleicos se pueden utilizar sin o con un mínimo de purificación para evitar pérdidas debido al procesamiento de la muestra.

Cuando los compuestos de ensayo comprenden compuestos diferentes de polipéptidos, anticuerpos, o ácidos nucleicos, tales compuestos se pueden preparar por cualquiera de una variedad de métodos de la técnica para llevar a cabo la síntesis química orgánica.

Ejemplos. Estudios estructural y funcional en la interacción de los dominios de protuberancias de fibras del adenovirus y desmogleina 2.

Resumen

Los serotipos de adenovirus humano (Ad) Ad3, Ad7, Ad11, Ad14 y una nueva cepa de reciente aparición de Ad14 (Ad14p1) utilizan la proteína de unión epitelial desmogleina 2 (DSG2) como un receptor para la infección. A diferencia de la interacción de Ad con CAR y CD46, los detalles estructurales para la unión de Ad a DSG2 son todavía evasivos. Utilizando un enfoque basado en las genotecas de expresión de *E. coli* de los mutantes de protuberancia de fibras Ad3 y Ad14p1 aleatorios identificamos restos de aminoácidos que, cuando mutaban individualmente, producían la ablación o reducían la unión de las protuberancias Ad a DSG2. Estos restos formaban tres grupos dentro de una ranura en el extremo distal de la protuberancia de fibra. La genoteca de mutantes de protuberancia de fibra Ad3 se puede utilizar también para identificar variantes con mayor afinidad a DSG2. Nosotros encontramos un número de mutaciones dentro o cerca del bucle EF de la protuberancia Ad3 que dio como resultado varios órdenes de magnitud de mayores afinidades a DSG2 comparado con las protuberancias Ad3 de tipo nativo. El análisis de la estructura cristalina de uno de los mutantes mostró que las mutaciones introducidas hacían el bucle EF más flexible, lo que podría facilitar la interacción con DSG2. Nuestros hallazgos tienen relevancia práctica para la terapia del cáncer. Recientemente hemos reportado que una protuberancia de fibra Ad3 que contiene la proteína recombinante (JO-1) es capaz de desencadenar la apertura de las uniones entre células de cáncer epitelial, que a su vez, mejoró mucho la penetración intratumoral y la eficacia de los agentes terapéuticos. Aquí se muestra que las versiones mejoradas por afinidad de JO-1 son terapéuticamente más potentes que la proteína parental en una serie de modelos de cáncer.

Introducción

Recientemente hemos identificado DSG2 como el principal receptor para un grupo de especies de adenovirus B, incluyendo adenovirus serotipo 3 (Ad3), un serotipo que está ampliamente distribuido en la población humana (42). Se encontró que el dominio (s) de interacción de DSG2 dentro de Ad3 está formado por varias protuberancias de fibras (41). Este modo específico de interacción DSG2-protuberancia de fibras Ad3 proporciona una alta avidéz y es funcionalmente relevante para la apertura de las uniones epiteliales (41, 42). Este último involucra el agrupamiento de DSG2 y la activación de las vías que recuerdan una transición epitelial a mesenquimal, incluyendo la fosforilación de quinasa MAP y la regulación negativa de la expresión de la proteína de unión (6, 40, 42). La capacidad para abrir las uniones epiteliales parece ser importante para la penetración de Ad3 en, y la propagación dentro de las células epiteliales de las vías respiratorias (40, 42). En un estudio reciente, se intentó encontrar el resto mínimo dentro de la cápside Ad3 que confiere eficacia a la unión a DSG2 (41). Hemos generado una pequeña proteína recombinante,

que contiene la protuberancia de fibra Ad3 y un dominio que permite la autodimerización de protuberancias de fibra Ad3 trimérico (JO-1) (41). JO-1 puede producirse fácilmente en *E. coli* y purificarse por cromatografía de afinidad. En cultivos de células epiteliales polarizadas JO-1 desencadenaron la apertura de uniones intercelulares mientras la inyección intravenosa de JO-1 en ratones con tumores epiteliales permitió una mejor penetración de los fármacos anticancerosos (5,6).

El primer objetivo del presente estudio fue el de delinear más las características estructurales de la interacción protuberancia de fibra Ad3-DSG2. Esto incluye identificar los restos de aminoácidos dentro de la protuberancia de fibra Ad3 que están involucrados en la unión a DSG2 y crear mutantes JO-1 con unión reducida y escindida a DSG2. El segundo objetivo de este estudio, que tiene relevancia translacional, fue mejorar aún más el JO-1 mejorando su afinidad a DSG2 aumentando así su efecto terapéutico. Esto se hizo mediante la identificación de mutantes con un aumento de la unión a DSG2.

Ambos objetivos se lograron utilizando la genoteca de expresión de *E. coli* de los mutantes de protuberancia de fibra Ad3. Hemos identificado restos en tres agrupaciones diferentes dentro de la protuberancia de fibra Ad3 que están críticamente involucradas en la unión a DSG2. Todos los restos están localizados dentro de una ranura en la terminación distal de la protuberancia de fibra frente al receptor. Después se evaluó el efecto de estas mutaciones sobre la capacidad de la protuberancia de fibra para abrir las uniones epiteliales mediante la medición de la resistencia eléctrica transepitelial en células epiteliales polarizadas *in vitro*, y la capacidad para mejorar la eficacia de un fármaco de quimioterapia en ratones con tumores de xenoinjertos epiteliales. Como era de esperar, cuando las mutaciones con afinidad reducida para DSG2 se introdujeron en JO-1, las proteínas resultantes fueron menos capaces de abrir las uniones epiteliales. Por otro lado, un número de mutaciones que incrementaban la afinidad de JO-1 a DSG2 mostraron una actividad más fuerte en la apertura de las uniones epiteliales. En general, estos estudios indican una correlación entre la afinidad de las protuberancias de fibra Ad3 a DSG2 y los efectos posteriores sobre las uniones epiteliales.

El tercer objetivo de este estudio fue delimitar la interacción de los restos de protuberancia de fibras con DSG2 de otro serotipo de Ad diana con DSG2; la cepa surgida recientemente Ad14p1 (44), que se considera más patogénica/virulenta que la cepa parental (Ad14-de Wit) (10, 16, 22). La distribución de la hoja beta de Ad14p1 difiere de la de Ad3, lo que podría dar lugar potencialmente a diferencias en el modo de unión a DSG2. Hemos generado por lo tanto una genoteca de expresión de *E. coli* de los mutantes de la protuberancia de fibra Ad14p1 para identificar los restos de Ad14p1 que interactúan con DSG2.

30 Materiales y métodos

Proteínas. La proteína DSG2 recombinante humana fue de Leinco Technologies, Inc. (St. Louis, MO). La protuberancia de fibra Ad3 se derivó del virus Ad3, cepa GB, obtenida de la ATCC. La protuberancia de fibra Ad14p1 se deriva del virus Ad14p1, cepa *Portland 2971/2007*, proporcionado por Centro para el Control y Prevención de las Enfermedades (Atlanta, GA) (44). Las protuberancias de fibra se produjeron en *E. coli* con etiquetas 6-His N-terminales, utilizando el vector de expresión pQE30 (Qiagen, Valencia, CA) y se purificaron por cromatografía de agarosa Ni-NTA como se describe en otra parte (43).

Líneas celulares. Células 293, HeLa y A549 se mantuvieron en DMEM suplementado con 10% de FBS, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina (P/S), glutamina (Glu) 2 mM y una solución de aminoácido no esencial 1x MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA). Células T84 de cáncer de colon (ATCC CCL-248) se cultivaron en una mezcla 1:1 de medio F12 de Ham y DMEM, 10% de FBS, Glu y P/S. Las células Ove316 son células tumorales epiteliales positivas Her2/neu derivadas de una biopsia de cáncer de ovario (32). Las células Ove316 se cultivaron en MEGM (Lonza, *Mapleton, IL*), que contiene 3 µg/L de hEGF, 5 µg/L de insulina, 5 mg/L de hidrocortisona, 26 mg/L de extracto de pituitaria bovina, 25 mg/L de anfotericina B (Lonza), suplementado con 1% de FBS, 100 I.U. de penicilina, 100 µg/L de estreptomina, 10 mg/L de ciprofloxacino. Células MDA-MB-231, línea celular triple negativa del cáncer de mama (ATCC-HTB-26) se cultivaron en medio L-15 de Leibovitz suplementado con 10% de FBS, 100 I.U. de penicilina, 100 µg/L de estreptomina. TCI-DSG2 se derivaron de células TCI, una línea celular C57B1/6 de cáncer de pulmón que expresa HPV16 E6 y E7 (36). Las células TCI se transdujeron con un vector de lentivirus pseudotipado VSVG que expresa DSG2 humano (42). Un clon que expresa DSG2 humano a un nivel visto en tumores humanos se seleccionó para estudios *in vivo*.

Los adenovirus. Propagación, marcación de metil-³H timidina, purificación y titulación de Ad3 de tipo nativo se llevó a cabo como se describe en otra parte (37). Ad3-GFP es un vector basado en Ad3 de tipo nativo que contiene un casete de expresión CMV-GFP insertado en la región E3 (42). Las concentraciones de las partículas virales (VP) se determinaron espectrofotométricamente midiendo la densidad óptica a 260 nm (OD₂₆₀). Los títulos de las unidades de formación de plaquetas (pfu) se llevaron a cabo utilizando células 293 como se describe en otra parte (29). La relación VP a pfu fue 20:1 para todas las preparaciones de virus.

genoteca de protuberancias Ad3. La secuencia de codificación de la protuberancia de Ad3 (aa 108-319) que contiene las dos últimas repeticiones de eje se obtuvo por PCR a partir de DNA de Ad3 utilizando los cebadores P1: 5'

ATCACGGATCCGGTGGCGGTTCTGGCGGTGGCTCCGGTGGCGGTTCTAACAACT

TTGCAGTAACTC 3' (SEC ID NO: 35) y P2:

5'CTCAGCTAATTAAGCTTAGTCATCTTCTCTAATATAG

GA 3' (SEC ID NO: 36), y clonado en pQE30 (Qiagen, Valencia, CA) para la expresión en *E.coli*. El plásmido resultante se llamó protuberancia pQE-Ad3. El PCR mutagénico aleatorio se llevó a cabo basándose en un protocolo publicado en otra parte (7, 8). Brevemente, 20 fmoles de la plantilla de DNA de la protuberancia pQE-Ad3, 30 pmoles (cada uno) de cebadores de PCR (Pmut1: 5'-

CCAATTCTATTGCACTTAAGAATAACACTTTATGGACAGGT-3' (SEC ID NO: 37) y Pmut2: 5'-GTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTAGTCATCTTC-3' (SEC ID NO: 38), 2,5 µl, 3,5 µl, 5 µl o 10 µl de 10x tampón mutagénico (MgCl₂ 70 mM, KCl 500 mM, Tris 100mM (pH 8,3 a 25°C), y 0,1% (p/v) de gelatina), 10 µl MnCl₂ 5mM, 10 µl de mezcla dNTP (dGTP 2 mM, dATP 2mM, dCTP 10mM, dTTP 10mM) y 5 unidades de Taq polimerasa (Promega, Madison, WI) se mezclaron en un volumen final de 100µl. Las condiciones de PCR fueron 94°C durante 1 min, 45°C durante 1 min, y 72°C durante 1 min (30 ciclos). Los productos mutantes de PCR (615 bp en longitud que contienen mutaciones solo en el marco de lectura de la cabeza de la protuberancia de fibra) se purificaron, digirieron con las enzimas apropiadas, y se clonaron en la protuberancia del plásmido pQE-Ad3. Para el control de la calidad de la genoteca mutagénica aleatoria, el producto de ligación se transformó en M15 de *E. coli* (Qiagen, Valencia, CA), se colocaron en placas de kanamicina y ampicilina, y se seleccionaron aleatoriamente 50 colonias para la secuenciación.

Genoteca Ad14: La secuencia de codificación de la protuberancia Ad14p1 (aa 108-323) que contiene las dos últimas repeticiones de eje se obtuvo por PCR de DNA de Ad14p1 utilizando cebadores P1: 5'

CATCACGGATCCGGTGGCGGTTCTGGCGGTGGCTCCGGTGGCGGTTCTAATAAAC

TTTGTACCAAATTGGGAGAAGG 3' (SEC ID NO: 39) y P2: 5'

GCTAATTAAGCTTAGTCGTCTTCTCTGATGTAGTAAAAGG 3' (SEC ID NO: 40), y se clonaron en pQE30 (Qiagen, Valencia, CA) para la expresión en *E. coli*. El plásmido resultante se denominó protuberancia Ad14p1 de pQE. El PCR mutagénico aleatorio se llevó a cabo utilizando cebadores de PCR (Pmut1: 5'-AACACCCTGTGGACAGGAGTTAACCC-3' (SEC ID NO: 41) y Pmut2: 5'-

CTCAGCTAATTAAGCTTAGTCGTC-3' (SEC ID NO:42)). Los productos mutantes de PCR (594 bp en longitud que contienen mutaciones sólo en el marco de lectura de la cabeza de protuberancia de fibra) se purificaron, se digirieron con las enzimas apropiadas, y se clonaron en la protuberancia del plásmido pQE-Ad14p1. Para el control de calidad de la genoteca mutagénica aleatoria, el producto de ligación se transformó en M15 de *E. coli* (Qiagen, Valencia, CA), se colocaron en placas de kanamicina y ampicilina, y se seleccionaron aleatoriamente 50 colonias para la secuenciación.

Ensayos de colonias. La genoteca de protuberancia Ad3 o Ad14p1 del plásmido mutante se transformaron en cepas huésped XL1 azul o M15 de *E. coli* y se colocaron en placas LB con los antibióticos apropiados, es decir, Amp o Amp+Kan, respectivamente. Después del crecimiento durante una noche, se colocó una membrana de filtro Durapore de 0,45 µm (Millipore, Billerica, MA) en la parte superior de las colonias. La membrana se despegó y se colocó cuidadosamente, con las colonias hacia arriba, sobre dos hojas de papel de 3MM empapadas en el medio LB suplementado con antibióticos y IPTG 1 mM. Se indujo la expresión de la proteína de las colonias durante 6 horas a 30°C, después de lo cual el filtro con las colonias se colocó en la parte superior de un filtro de nitrocelulosa y un papel Whatman 3MM empapado en tampón de lisis nativo {Tris-Cl 20 mM (pH 8), NaCl 300 mM, MgCl₂ 50 mM, 0,1 mg/ml de lisozima, 0,75 mg/ml de DNasa I, ½ comprimido del coctel inhibidor de proteasa complete libre de EDTA/10 ml (Roche, Palo Alto, CA)}. El "filtro sándwich" se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y después se congeló-descongeló 4 veces durante 10 minutos a -80°C y 10 minutos a 30°C. La membrana de nitrocelulosa se separó del sándwich y se bloqueó con 3% de BSA en TBST a 4°C durante la noche. La transferencia se incubó después con 0,1 ng/ml de proteína DSG2 recombinante (Leinco, St. Louis, MO) en TBST/BSA, seguido por anticuerpos monoclonales anti-DSG2 de ratón (Clon 6D8; SeroTec Ltd., Oxford, UK) y anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano. Las colonias sin la unión a DSG2 se recogieron y cultivaron en 3 ml de medio LB durante la noche. La expresión de la proteína se indujo con IPTG 1 mM durante 5 horas, las bacterias se sedimentaron después, se resuspendieron en un tampón de carga de SDS y se congelaron/descongelaron 3 veces. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpos anti-His (MCA1396, Sertec) para evaluar la trimerización de la protuberancia de Ad. Para detectar los mutantes con las uniones más fuertes a DSG2, la genoteca de mutantes de la protuberancia Ad3 se transformó en la cepa huésped M15 de *E.coli*. Se indujo la expresión de la proteína de las colonias durante sólo 20 minutos a temperatura ambiente. Se seleccionaron las colonias que mostraron la señal de unión a DSG2 más intensa.

Transferencia de Western

Se utilizaron geles prefabricados Mini-PROTEAN (BIO-RAD, Hércules, CA) con 4-15% de gradiente de poliacrilamida. Un total de 1 µg de proteína mezclado con 2x tampón de carga (Tris-HCl 10 mM, pH 6,8, DTT 200 mM, 4% de SDS, 20% de glicerol, 0,2% de bromofenol azul) se cargaron por carril. Las muestras o se hirvieron (B) durante 5 minutos o se cargaron sin hervir (UB). Se utilizó el siguiente tampón de corrida: Tris 25 mM, pH 8,3, glicina 0,192 M, 0,1% de SDS. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a la nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpos de proteínas DSG2 humanas y anticuerpos anti-DSG2 recombinantes como se describió previamente (42). Las transferencias de Western se escanearon y se cuantificaron utilizando un software ImageJ 1.32 (National Institutes of Health, Bethesda, MD). La intensidad de la banda JO-1 se fijó como 100%. Para el análisis de la actividad de la quinasa MAP, cultivos de T84 polarizados se lisaron en Hepes 20 mM (pH 7,5), EGTA 2 mM, 10% de glicerol, 1% de TritonX100, PMSF 1 mM, Na₃VO₄ 200 µM e inhibidores de proteasa) en hielo. Después de la sonicación, las muestras se sedimentaron y la proteína que contiene el sobrenadante se almacenó a -80°C. 15 µg de proteína total se utilizó para las transferencias de Western con mAb frente a fosfo-p44/42 MAPK (Erk1/2)(Thr202/Tyr204)(Cell Signaling Danvers, MA) o mAb frente a anti-Erk1/2 (Cell Signaling).

Ensayos de competición. Las células HeLa se desprendieron de las placas de cultivo por incubación con Versene y se lavaron con PBS. Un total de 10⁵ células por tubo se resuspendieron en 50 µl de tampón de adhesión enfriado con hielo (DMEM suplementado con MgCl₂ 2 mM, 1% de FBS, y HEPES 20 mM) conteniendo diferentes concentraciones de la proteína de protuberancia de fibra Ad3, y se incubaron en hielo durante 1 hora. Después, un virus Ad3 de tipo nativo marcado en ³H se añadió al tampón de adhesión a una multiplicidad de infección (MOI) de 8.000 partículas virales (vp) por célula a un volumen final de 100 µl. Después de 1 hora de incubación en hielo, las células se sedimentaron y se lavaron dos veces con 0,5 ml de PBS enfriado en hielo. Después del último lavado, el sobrenadante se eliminó y la radioactividad asociada a la célula se determinó mediante un contador de centelleo. El número de VP unidas por célula se calculó utilizando la radioactividad específica del virión y el número de células.

Resonancia de plasmón superficial. Las adquisiciones se hicieron en un instrumento BIAcore 3000. HBS-N (GE-Healthcare, Pittsburgh, PA) suplementado con CaCl₂ 2 mM se utilizó como tampón de corrida en todos los experimentos a una velocidad de flujo de 5 µl/min. La inmovilización en un chip sensorial CM4 (BIAcore) se llevó a cabo utilizando DSG2 a 10 µg/ml diluido en tampón acetato 10 mM pH 4,5 inyectado durante 10 minutos en etil(dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC)/N-hidroxisuccinimida (NHS) activado por la celda de flujo. Una celda de flujo de control se activó por (EDC/NHS) y se inactivó por etanolamina. Se inyectaron diferentes concentraciones de proteínas de protuberancia de fibra Ad3 para la asociación durante 3 minutos seguido por 2,5 minutos de tiempo de disociación, y la señal se restó automáticamente del blanco de la celda de flujo EDC-NHS desactivada con etanolamina. Las constantes cinéticas y de afinidad se calcularon utilizando un software BIAeval.

Cristalografía: Las condiciones de cristalización para los mutantes de protuberancias wtAd3 y K217E/F224S utilizó el servicio de High Throughput Screening Lab en Hauptman Woodward Medical Research Institute. Para los estudios de difracción, los mutantes de protuberancias wtAd3 y K217E/F224S se cristalizaron utilizando el método de la gota colgante. Los cristales se cultivaron utilizando una solución de depósito de MgSO₄(7H₂O) 1,65M en tampón TAPS 0,1 M pH 9,0 y una solución de proteína de 15 mg/ml. Los cristales se congelaron utilizando un crioprotector compuesto de un 85% de la solución de depósito y un 15% de glicerol (v/v). La recolección de datos se llevó a cabo a 100K en ID14-4 del ESRF utilizando el conducto EDNA (19). Los datos se indexaron y escalaron utilizando XDS/XSCALE (20, 21) y la estructura se resolvió mediante desplazamiento molecular (PDB 1H7Z) con el programa PHASER (25). El modelo se construyó y se refinó utilizando COOT (14) y PHENIX (2), respectivamente (Tabla I). La entrada "estructura del mutante K217E y F224S del dominio de protuberancia del adenovirus 3" se le ha asignado el código rcsb080687 de RCBS ID y 4LIY de PDB ID.

Tabla 1. Colección de datos y estadísticas de refinamiento.

Protuberancia Ad3 (mutante K217E/F224S)	
Longitud de onda (Å)	5
Intervalo de resolución (Å)	48 – 2,1 (2,175 – 2,1)
Grupo espacial	P 32 2 1
Celda unidad	96,663 96,663, 156,399, 90, 90, 120
Reflexiones totales	222816 (21396)
Reflexiones únicas	49784 (4831)
Multiplicidad	4,5 (4,4)
Complejidad (%)	99,61 (98,96)
Media (I)/sigma (I)	11,46 (1,89)

	Factor Wilson B	40,48
	R-merge	0,07161 (0,6146)
	R-meas	0,08092
	CC1/2	0,998 (0,801)
5	CC*	1 (0,943)
	R-trabajo	0,1759 (0,2670)
	R-libre	0,2012 (0,3133)
	Número de átomos	4587
	macromoléculas	4310
10	ligandos	5
	agua	272
	Restos de proteínas	553
	RMS (enlaces)	0,011
	RMS (ángulos)	1,27
15	Ramachandran Favorecido (%)	96
	Ramachandran Valores atípicos (%)	0
	Puntuación de choque	4,58
	Promedio factor B	50,00
	macromoéculas	49,80
20	Ligandos	126,60
	Disolvente	51,00

La estadística para la capa de más alta resolución se muestra entre paréntesis.

25 Estructura 3D: El software Pymol se utilizó para analizar la estructura. Las mutaciones en el dominio de protuberancia de Ad3 (pdb 1H7Z) se tiñeron utilizando diferentes colores en la isosuperficie púrpura. Monómeros del mutante K217E/F224S de la protuberancia de Ad3 fueron dibujados en colores con las mutaciones en barras y superpuesto los dibujos en gris de la protuberancia de fibra Ad3 de tipo nativo.

30 Microscopía electrónica de tinción negativa: La proteína JO-2 recombinante se visualizó por EM de tinción negativa para evaluar su estado de ensamblaje. Se utilizó la preparación mica-carbono estándar con proteína a 0,1 mg/ml. La muestra se tiñó utilizando 1% (peso/volumen) de silicotungstato de sodio (pH 7,0) y se visualizó en un microscopio electrónico JEOL-1200 a 100 KV.

35 Ensayos de permeabilidad: Un total de 5×10^5 células T84 se sembraron en encartes transwell (membrana PET, con tamaño de poro de 0,4 μm (Coring, NY) y se cultivaron durante más de 14 días hasta que la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) fue estable. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días. Las células se expusieron a ligandos DSG2 (20 $\mu\text{g/ml}$) en el medio de adhesión (DMEM, 1% de FBS, MgCl_2 2 mM, HEPES 20 mM) durante 15 minutos a temperatura ambiente y la TEER se midió y calculó como se describe en otra parte (39).

40 Estudios sobre animales: Todos los experimentos que involucran animales se realizaron de acuerdo con las directrices institucionales establecidas por la Universidad de Washington. Los ratones se alojaron en instalaciones específicas libres de patógenos. *Ratones inmunodeficientes (CB17)* [nombre de la cepa: NOD.CB17-Prkde^{scid}/J] se obtuvieron de Jackson Laboratory. Los ratones transgénicos DSG2 humano contienen 90kb del locus DSG2 humano y expresan hDSG2 a un nivel y en un patrón similar a los humanos (40).

45 Xenoinjertos tumorales A549, MDA-MB-231, y ove316 se establecieron por inyección de las correspondientes células tumorales en la almohadilla de grasa mamaria (1:1 con Matrigel) de ratones CB17. Tumores TC1-DSG2 se establecieron por inyección subcutánea de células TCI-DSG2 en ratones DSG2 transgénicos. JO-0, JO-1, JO-2, o JO-4 se inyectaron intravenosamente una hora antes de la aplicación de los fármacos quimioterapéuticos: Irinotecan/CamptosarTM (Pfizer Inc., Groton, CT), doxorubicina liposomal PEGilata/LipodoxTM (Sun

Pharmaceuticals IN, India), cetuximab/ErbituxTM (ImClone, Somerville, NJ), paclitaxel conjugado con nanopartículas de albúmina/AbraxanoTM (Abraxis Biosciences, Summit, NJ). Los volúmenes tumorales se midieron tres veces a la semana. Cada grupo de tratamiento consistió en un mínimo de 5 ratones. Los animales se sacrificaron y el experimento terminó cuando los tumores en uno de los grupos alcanzaron un volumen de 800 mm³ o los tumores mostraron ulceración.

Anticuerpos anti-JO4: Las concentraciones de anticuerpo anti JO-4 en muestras de suero humano se midieron mediante ELISA. Las placas se recubrieron con anticuerpos de fibra anti Ad3 policlonales de conejo (42), seguido de JO-4 recombinante, muestras de suero humano (dilución 1:2 a 1:1000), y IgG-HRP anti humano. Las muestras de suero de los pacientes con cáncer de ovario fueron proporcionadas por el Pacific Ovarian Cancer Research Consortium.

Estructura 3D: Se utilizó el software pymol para visualizar la estructura 3D de la protuberancia de fibra Ad3 (MMDB ID: 16945, PDB ID: 1H7Z (13)).

Análisis estadístico: Todos los resultados se expresaron como media +/- SD. Se aplicó 2-vías ANOVA para pruebas múltiples. Los números de animales y los valores de P se indican en las leyendas de las figuras.

Resultados

Restos críticos para la unión a DSG2. Primero centramos nuestro trabajo en Ad3. La unión de alta afinidad a DSG2 y la consiguiente apertura de la unión epitelial requiere varias protuberancias de fibra trimérica en una constelación espacial presente en el virión, PtDd, o protuberancia de fibra Ad3 dimerizada (trimérica) (por ejemplo, JO-1) (41). La protuberancia de fibra recombinante (trimérica) con dos motivos de eje, pero sin dominio de dimerización ("monómero de protuberancia Ad3") se une a DSG2 con una afinidad que es varios órdenes de magnitud menor que JO-1, no es capaz de bloquear la infección Ad3, y no desencadena la apertura de las uniones (37, 41, 42). Sin embargo, la afinidad del "monómero de protuberancia Ad3" es lo suficientemente alta para detectar la unión en las transferencias de Western en las que el DSG2 soluble se utiliza como sonda. Por lo tanto hemos utilizado mutantes del "monómero de protuberancia Ad3" marcados con HIs de la genoteca de expresión de *E. coli* para identificar los restos de aminoácidos dentro de la protuberancia de fibra Ad3 que son críticos para la unión a DSG2. Para generar esta genoteca empleamos PCR mutagénico (7, 8) en un protocolo que en promedio generó una o dos sustituciones de aminoácidos por protuberancia. La genoteca de protuberancia de fibra Ad3 en XL-1 azul de *E. coli* se colocó en placas de agar, la expresión de la protuberancia se indujo por IPTG, y las colonias se cribaron para la unión a DSG2 utilizando anticuerpos DSG2 y anti-DSG2 recombinantes. Una primera ronda de cribado de ~ 10.000 colonias para variantes que no se unieron a DSG2 reveló 240 colonias candidato. Cuando se analizaron por la transferencia de Western para las 6xHis marcadas, 40 de las 240 colonias mostraron expresión de la protuberancia de fibra trimérica, lo que indica la ausencia de grandes cambios conformacionales. Las variantes restantes tenían protuberancias de fibra truncadas o no formaban trímeros. Se secuenciaron los 40 plásmidos correspondientes. La gran mayoría de colonias tenían sustituciones de aminoácidos individuales dentro de la protuberancia de fibra. Cuando se encontraron sustituciones múltiples de aminoácidos por protuberancia, nuevos genomas de protuberancia de Ad3 que contienen las correspondientes mutaciones se sintetizaron individualmente. Rondas adicionales de cribado de colonias no descubrieron otras regiones, lo que indica que se habían encontrado todos los restos que interactuaban con DSG2. Un total de 8 mutantes independientes se utilizaron después para estudios posteriores (Fig. 1A). Para todos los estudios posteriores, generamos formas de autodimerización de los mutantes de fibra Ad3 (Fig. 1B) y los purificamos por cromatografía de afinidad utilizando columnas NTA-Ni. Los mutantes de las protuberancias dimerizadas purificados se analizaron por la unión a DSG2 por la transferencia de Western (Fig. 1C-F). Todos los mutantes fueron severamente reducidos en la unión cuando se compara con JO-1 (es decir, la forma dimerizada que contiene la protuberancia de fibra wt Ad3). Los mutantes D261N y F265L había sufrido casi completamente ablación para la unión a DSG2, mientras que los otros mutantes tenían diferentes niveles de unión residual a DSG2 (3,6% - 20% de la protuberancia wt Ad3) (Tabla 2, "transferencia de Western"). Los restos identificados, críticos para la unión de la protuberancia de Ad3 a DSG2, estaban en tres diferentes áreas de la protuberancia de fibra Ad3 dentro del bucle-CD/hoja beta D (N186D, V189G, S190P), el bucle-FG/hojas beta G (D261N, F265L), y hoja beta H/bucle-HI (L292A, L296R, E299V) (Fig. 1A). En un modelo 3D de la protuberancia de fibra Ad3 (número de acceso PDB 1H7Z_A), todos los restos identificados se localizaban en el lado apical de la protuberancia de fibra y seguido de una ranura específica en la protuberancia (Fig. 2). Es de destacar, que excepto F265L, todas las otras sustituciones dieron como resultado un cambio de carga en el resto correspondiente. Las diferencias en los patrones de las migraciones en los geles de poliacrilamida (por ejemplo para D261N) indican que las sustituciones han causado cambios conformacionales. Actualmente estamos intentando cristalizar estos mutantes para analizar su estructura 3D.

Para crear una protuberancia de fibra Ad3, y eventualmente un virus Ad3 con máxima ablación de la unión a DSG2 introducimos múltiples mutaciones en las tres áreas identificadas, específicamente una combinación de N186D y D261N, una combinación de D261N y L296R, y una combinación de las tres N186D, D261N, y L296R. Como era de esperar la combinación de las mutaciones en las tres regiones críticas confirió el más alto nivel de ablación (Tabla 2, "transferencia de Western", Fig. 1F).

	Transferencia de Western Unión al resto de DSG2 (protuberancia wtAd3 = 100%)*	Inhibición de la infección en presencia de protuberancia dimérica (JO-1 = 100%)	Inhibición de la fijación en presencia de protuberancia dimérica (JO-1 = 100%)
N186D	5,3%	32,7	56,5
V189G	14	54	81
S190P	7,1	30,9	73,4
D261N	0	5,3	45
F265L	0	17,6	55,6
L296R	3,6	5,1	73,7
E299V	20	50,7	97,3
N186D, D261N	7,0	5,2	23,5
D261, L296R	7,0	1,5	20,1
N186D, D261N, L296R	0	0	18,5

Tabla 2: Análisis de los mutantes de fibra Ad3. La segunda columna muestra el análisis cuantitativo de las bandas de la transferencia de Western que corresponden a los trímeros de protuberancias de Ad3. La intensidad de la protuberancia de fibra wt Ad3 se tomó como el 100%. Los datos en la tercera columna reflejan la capacidad de los mutantes de protuberancia de fibra Ad3 diméricos para inhibir la infección Ad3-GFP (véase Fig. 3B). Cuanto más alto es el porcentaje, más fuerte es la inhibición. La inhibición por JO-1 (protuberancia wtAd3 dimérica) se toma como 100%. La cuarta columna muestra los datos correspondientes a la fijación del virus Ad3. N = 3. Se muestran promedios. La desviación estándar fue menor del 10%.

Debido a su relevancia como un patógeno recientemente aparecido, generamos también una genoteca de mutantes de protuberancia de fibra Ad14p1 ("monomérico"). Un primer cribado reveló 300 colonias candidato para variantes que no se unen a DSG2. Cuando se analizaron por la transferencia de Western para las 6xHis marcadas, 45 de las 300 colonias mostraron expresión de la protuberancia de fibra trimérica. La secuenciación de estas variantes reveló 15 mutantes independientes que redujeron su unión a DSG2 (Fig. 1A). Curiosamente, a pesar de una distribución de hoja beta diferente, los restos de aminoácidos que eran críticos para la unión a la protuberancia Ad14p1 estaban en las mismas tres regiones que fueron identificadas para la protuberancia de fibra Ad3. Debido a estas similitudes, llevamos a cabo estudios adicionales sólo con los mutantes de protuberancia de fibra Ad3 seleccionados.

Validación funcional. Los estudios de competición se llevaron a cabo en células HeLa, que expresan DSG2 (42). Primero estudiamos la fijación del virus Ad3 marcado en ³H después de la preincubación de las células con las protuberancias de fibras Ad3 diméricas (Fig. 3A). La reducción en la unión del virus Ad3 se comparó con la preincubación con JO-1, es decir, la proteína dimérica que contenía la protuberancia de fibra Ad3 de tipo nativo. La inhibición de la unión por JO-1 se tomó como el 100%. Los mutantes L296R, D261N, y F265L bloquearon la unión del virus Ad3 al menos (5,1, 5,3, y 17,6%), seguido por los mutantes S190P, N186D, y E299V (unión reducida un 30,9, 32,7, y 50,7%, respectivamente) (Tabla 2, "fijación"). Una configuración de ensayo similar se utilizó para medir la capacidad de los mutantes de protuberancia de Ad3 para bloquear la transducción de las células HeLa por un vector Ad3-GFP. La transducción se midió en base a la expresión de GFP (Fig. 3B). Similar a lo que observamos en el estudio adjunto, la infección Ad3-GFP se redujo menos por la preincubación con los mutantes D261N y F265L, seguido de los mutantes N186D, S190P, L296R, y V189G. Tomando la unión a DSG2 (transferencia de Western), fijación, y datos de la competencia de la infección juntos, concluimos que el área que contiene los restos 261 a 265 es el área más crítica en la unión a DSG2. La región alrededor de los restos 186-190 también contribuyen a la unión, mientras que la región que contiene el resto 299 parece estar solo marginalmente implicado en la unión. Los mutantes de protuberancia Ad3 dimérica con mutaciones combinadas se analizaron también para su capacidad para competir con el virus Ad3 para su fijación (Fig. 3C) e infección (Fig. 3D). El mutante con mutaciones en las tres áreas (N186, D261, L296) no bloquearon la unión o infección Ad3 incluso a concentraciones de 200 µg/ml lo que indica que está casi ablatida para la unión DSG2. Cabe destacar que, cuando se utilizó sCD46 como una sonda en la transferencia de Western de las fibras Ad3 de tipo nativo, no se observó uniones específicas (Fig. 4). Esto indica que Ad3 solo se une ineficazmente a CD46.

Correlación de la unión reducida a DSG2 y la capacidad más débil para abrir las uniones epiteliales. Un ensayo sencillo para la función de apertura de la unión de mutantes de protuberancia Ad3 dimérica se basa en la medida de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) en cultivos celulares transwell. Las células cancerígenas epiteliales se

cultivan hasta que la TEER es constante, cuando se forman grandes uniones intercelulares. La adición de JO-1 durante 1 hora en el lado apical de los cultivos transwell dio como resultado una rápida disminución de la TEER lo que indica la apertura de las uniones (Fig. 5A). La incubación con un mutante D261N no tuvo efecto en la TEER. N186D y E299V tuvieron efectos intermedios que se correlacionan con la unión residual de las correspondientes protuberancias de fibra a DSG2. En estudios previos, hemos establecido también que JO-1 provocó cambios en las uniones epiteliales de los tumores de xenoinjerto y aumentó la eficacia anti tumoral de los agentes quimioterapéuticos con altos pesos moleculares, por ejemplo irinotecan. (Irinotecan tiene un peso molecular de 586,7 Da y se utiliza para tratar cáncer de colon y pulmón). Utilizamos este efecto para evaluar la función de los mutantes de protuberancia de Ad3 dimérica *in vivo* (Fig. 5B). De manera similar a lo que observamos *in vitro*, JO-1 mejoró la terapia de irinotecan mientras que los mutantes con la unión a DSG2 reducida no tuvieron efecto significativo en la eficacia del irinotecan.

Afinidad mejorada de las protuberancias de fibra Ad3 dimérica. Como se indicó anteriormente, JO-1 es relevante para la terapia del cáncer. Por lo tanto es importante para entender mejor los detalles estructurales de su interacción con DSG2 y crear mutantes JO-1 con afinidad aumentada a DSG2. La mejora de la afinidad de los compuestos biológicos se utiliza para: i) reducir su dosis efectiva, ii) aumentar su vida media, iii) aumentar potencialmente sus efectos terapéuticos, y iv) evitar los efectos adversos de los anticuerpos generados por los pacientes frente a los compuestos biológicos (por ejemplo, neutralización o cambios en las farmacocinéticas). Para hacer análogos de JO-1 con afinidad aumentada, examinamos la genoteca de expresión de *E. coli* con mutaciones aleatorias dentro de JO-1 para las variantes con una mayor unión a DSG2. Fuera de las 10.000 colonias sembradas, se recogieron 20 colonias con las señales más intensas de DSG2 y se secuenció el DNA plasmídico. Se identificaron siete diferentes mutantes con una o dos sustituciones de aminoácidos: Y250F, K217E+F224S, N293S, V239D, F224L, E248G+K258E, y L277R+N293D. La localización de los restos en las estructuras primaria y 3D de la protuberancia de fibra Ad3 se muestran en la Fig. 6. En particular, la mayoría de las mutaciones se localizaban dentro del bucle EF, lo que indica que este bucle está involucrado en la estabilización de la interacción entre Ad3 y DSG2. V239 y Y250 no están expuestos en la superficie de la protuberancia lo que sugiere un cambio estructural en la protuberancia en lugar de una implicación en la unión directa a DSG2 (Fig. 6B, panel derecho). Las proteínas de protuberancias de Ad3 dimérica mutante recombinante se purificaron después. Para medir la afinidad de los mutantes a DSG2, llevamos a cabo estudios de resonancia de plasmón superficial. El resultado de los estudios con protuberancias que contienen el dominio de dimerización fue complejo, muy probablemente debido al hecho de que estos mutantes formaban complejos multiméricos. Para ello hemos realizado estudios con proteínas de protuberancias que carecen de dominio de dimerización ("no DD"). La constante de velocidad de asociación (K_a o K_{on}), y la constante de velocidad de disociación (K_d o K_{off}), así como la K_D de la protuberancia wt Ad3 y todos los mutantes de la protuberancia se muestran en la Fig. 7. De acuerdo con estudios previos (41), encontramos que la protuberancia wt Ad3 sin el dominio de dimerización se unía a DSG2 sólo con relativamente baja afinidad ($K_D = 10 \mu M$). Con excepción del mutante L227R/noDD+N293D/noDD, todos los mutantes identificados en la criba de la transferencia de la colonia tenían mayores afinidades a DSG2. Notablemente, las afinidades de los mutantes Y250F/noDD o V239D/noDD fueron 885 o 405 veces mayores que la de la protuberancia wt Ad3/noDD. La afinidad alta de los diferentes mutantes se debía principalmente a la más rápida asociación a DSG2 mas que a un cambio en la velocidad de disociación. La única excepción a esta tendencia fue el mutante N293S/noDD, para el que la velocidad de asociación fue más baja cuando se comparó con otros mutantes. Sin embargo, esto se compensaba parcialmente por una velocidad de disociación mas lenta. En conjunto estos resultados indican que la unión de la protuberancia de wt Ad3 (no DD) a DSG2 está principalmente limitada por una lenta velocidad de asociación que se puede mejorar por un panel de mutaciones. Estas mutaciones no parecen modificar la estabilidad de esta interacción sino el balance de asociación frente a disociación, dando como resultado afinidades más altas de los ligandos al receptor.

Para entender mejor los elementos estructurales que mejoran la unión a DSG2, llevamos a cabo análisis más detallados con el mutante K217E/F224S. La microscopía electrónica de transmisión de las protuberancias de fibra K217E/F224S teñidas con acetato de uranilo que contienen el dominio de dimerización mostraron partículas con 6 protuberancias que representan fibras triméricas dimerizadas (Fig. 8A, flechas gruesas y Fig. 8B). Curiosamente, bajo estas condiciones las protuberancias de fibras tomaron también formas regulares (con ~30 nm de diámetro) que se asemejan a PtDd colapsado (Fig. 8A, flechas finas y Fig. 8C). Después realizamos estudios de cristalografía de rayos X para resolver la estructura del mutante K217E/F224S a nivel atómico (Figs. 8D-H). Como era de esperar, el mutante K217E/F224S formó un monómero de las protuberancias de fibra (Fig. 8E). La estructura 3D del mutante se superpuso con la de la protuberancia de fibra Ad3 de tipo nativo (Fig. 8F-H). Esto reveló que el bucle EF en el mutante K217E/F224S estaba completamente desordenado. Este bucle está en la base del domino de protuberancia en la unión con el eje de la fibra. Las mutaciones K217E/F224S pueden por lo tanto permitir la unión más fácil para aumentar la flexibilidad de esta región de bucle.

Correlación de la afinidad aumentada con la capacidad más fuerte para abrir las uniones epiteliales

Para los siguientes estudios utilizamos formas de protuberancia de fibra Ad3 que contienen el dominio de dimerización. Para analizar los mutantes de alta afinidad seleccionados, realizamos estudios de infección por competencia con Ad3-GFP en células HeLa y las formas diméricas de afinidad mejorada de los mutantes de fibras Ad3 (Fig. 9A). Basado en la expresión de GFP, todos los mutantes diméricos excepto el mutante L277R+N293D inhibieron la infección Ad3-GFP más significativamente que JO-1. En particular, las formas no dimerizadas de las

protuberancias de fibras Ad3 con mayor afinidad a DSG2 eran incapaces de actuar como competidores en los estudios de transducción (Fig. 9B). La mayor afinidad a DSG2 dio como resultado una mayor capacidad para abrir las uniones epiteliales en los cultivos transwell (Fig. 9C). En comparación con JO-1, la TEER en cultivos incubados con los mutantes V250F, V239D, y K217E+F224S fue significativamente mayor.

Dos de las versiones de mayor afinidad de JO-1, Y293D y V250F se analizaron en el ensayo *in vivo*. Denominamos estos mutantes como JO-2 y JO-4, respectivamente. El primer estudio se realizó en un modelo de xenoinjerto derivado de células A549 similares a las del estudio descrito para la Fig. 5B. La Figura 10A muestra que los mutantes con mayor afinidad JO-2 y JO-4 aumentaron la terapia con irinotecan significativamente más que JO-1 ($p < 0,05$ a partir del día 27). Además, JO-4 ($K_D = 11,4$ nM) fue significativamente más eficaz que JO-2 ($K_D = 24,9$ nM), lo que indica una correlación entre la afinidad a DSG2 y el efecto terapéutico. Estudios adicionales se realizaron en tumores de xenoinjerto derivados de células ove316, (30, 32). Las células ove316 son células tumorales epiteliales Her2/neu positivas derivadas de una biopsia de cáncer de ovario. Estas células pueden experimentar EMT y el proceso inverso, transición mesenquimal a epitelial (MET), bajo condiciones específicas *in vitro* e *in vivo*. Una subfracción de células ove316 que es positiva para Nanog, CD133, y E-cadherina se enriquece en células madre de cáncer, es decir, células de autorenovación con potencial pluripotente y capacidad para formar tumores (30). Por lo tanto las células ove316 modelan de cerca la heterogeneidad y plasticidad observada en tumores *in situ*. La inyección intravenosa de JO-1 a una dosis de 2 mg/kg una hora antes de la inyección de doxorubicina liposomal PEGilada (PLD), un fármaco que es ampliamente utilizado para quimioterapia de cáncer de ovario, aumenta significativamente la eficacia del tratamiento (Fig. 10B). Es importante destacar que, a una dosis de 0,5 mg /kg de JO-4 tuvo incluso un mayor efecto estimulante en la terapia con PLD. Finalmente, probamos JO-4 en un modelo para cáncer de mama triple negativo (TNBC). TNBC se caracteriza por una falta o mínima expresión del receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) y la ausencia de sobreexpresión de Her2/neu. TNBC considera el 15% de todos los cánceres de mama. La supervivencia total es pequeña si se compara con eso en pacientes que tienen otros fenotipos. Un rasgo característico de TNBS es los altos niveles de DSG2 y las uniones epiteliales. Resultados clínicos prometedores en el tratamiento de TNBS se han logrado con nanopartículas, paclitaxel conjugado a albúmina (nab-paclitaxel/AbraxaneTM) sólo o en combinación con el mAb dirigido a EGFR cetuximab/ErbixTM (38). Nuestro estudio mostró que JO-4 aumentaba significativamente la terapia con nab paclitaxel/cetuximab en un modelo de ratón con tumores TNBC ortotópicos (Fig. 10C). Debido a su relevancia terapéutica, estudiamos además JO-4 en un modelo de tumor de ratón adecuado. Debido a que los derivados del virus Ad3 y de protuberancia de fibras Ad3 no se unen a células y tejidos del ratón nosotros usamos ratones transgénicos humanos que expresan DSG2 humano en un patrón y a un nivel similar a los humanos (40). Estos ratones fueron implantados subcutáneamente con tumores TC1-hDSG2 singénicos. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de ~600 mm³, JO-1 o JO-4 se inyectaron por vía intravenosa para los estudios de seguridad y eficacia. Ambas concentraciones en suero de JO-1 y JO-4 disminuyeron más de un orden de magnitud dentro de una hora después de la inyección, por lo cual la disminución fue mayor para JO-4 ($p < 0,01$ para 1 hora después de la inyección) (Fig. 11A). Después de una hora después de la inyección la concentración de JO-1 y JO-4 alcanzó una meseta con ~100 ng/ml. También analizamos los parámetros hematológicos después de la inyección intravenosa de JO-1 y JO-4. La química de la sangre no mostró cambios anormales. El recuento de células sanguíneas fue normal excepto para el número de linfocitos y plaquetas, que disminuyeron pronto después de la inyección (Fig. 11B). El recuento de linfocitos y plaquetas alcanzó un punto más bajo a las 24 horas después de la inyección, con números significativamente más bajos para JO-4 ($p < 0,01$). Curiosamente el recuento de linfocitos y plaquetas volvió a los niveles normales más rápido en JO-4 inyectado en ratones que en animales tratados con JO-1.

JO-1 y JO-4 son proteínas e inmunogénicos derivados de virus. En ratones inmunocompetentes, los anticuerpos IgG en suero frente a estas proteínas se detectaron mediante ELISA dos semanas después de la inyección (5). Una de las premisas teóricas para el aumento de la afinidad de las proteínas terapéuticas es que evita los anticuerpos neutralizantes del suero. Para probar esto, llevamos a cabo inyecciones repetidas de JO-1 y JO-4 en un modelo de tumor de ratón hDSG2 inmunocompetente con tumores TCI-hDSG2 (Fig. 11C). Después de dos ciclos de tratamiento de JO-1 y PLD, se interrumpió el tratamiento y se permitió que los tumores re-crecieran. El tercer y cuarto ciclo de tratamiento empezaron en los días 28 y 35, respectivamente. En el tiempo del tercer ciclo, se detectaron los anticuerpos anti-JO-1 en el suero mediante ELISA. Es importante destacar, en ambos, en el tercer y cuarto ciclo de tratamiento JO-1 y JO-4 tuvieron un efecto potenciador sobre la terapia PDL, por lo que el efecto de mejora fue significativamente más fuerte para JO-4.

En general, nuestros estudios funcionales con mutantes de fibra Ad3 dimérica con mayor afinidad demuestran una correlación entre la afinidad a DSG2 los efectos terapéuticos/apertura de la unión epitelial.

Discusión

Restos involucrados en la unión de protuberancias de Ad3 a DSG2. A diferencia de la interacción de Ad con CAR y CD46 (4, 28), detalles estructurales en la interacción de Ad con DSG2 son todavía evasivos. Aunque la estructura cristalina de la protuberancia de fibra Ad3 se ha resuelto, para DSG2, la estructura 3D de sólo el más distal de los cuatro dominios extracelulares (ECD) está disponible (MMDB ID: 59843). Sin embargo, nuestros estudios de competición previos con anticuerpos monoclonales frente a diferentes dominios DSG2 indicaron que los ECDs 3 y 4 estaban involucrados en la unión a Ad3 (42). En este estudio utilizamos análisis basado en mutagénesis para identificar los restos de aminoácidos dentro de la protuberancia de fibra Ad3 que son críticos para la unión a DSG2.

El análisis mutagénico de DSG2 no fue posible porque, cuando se expresó en *E. coli*, la proteína no se unió a Ad3, lo que indica que el procesamiento post traduccional es necesario para crear sitios de unión a Ad3 activos dentro de DSG2 (datos no mostrados). Los restos identificados, críticos para la unión de la protuberancia de Ad3 a DSG2, estaban en tres áreas diferentes de la protuberancia de fibra Ad3 y formaban una bolsa de unión potencial localizada en una ranura en el extremo distal de la protuberancia de fibra, frente al receptor. En particular, la unión de otros serotipos de Ad a CAR o CD46 implica principalmente regiones en el lado lateral o basal de las correspondientes protuberancias de fibra (27, 43). Nuestros datos indican que Ad3 utiliza diferentes estrategias de unión. Actualmente estamos realizando estudios cristalográficos con protuberancias de fibra Ad3 diméricas y DSG2. Teniendo en cuenta que las protuberancias de fibras Ad3 multiméricas agrupan varias moléculas de DSG2 (41), es de esperar que la estructura 3D de este complejo sea complicada. Queda por estudiar si los restos críticos para la unión de la protuberancia de fibra Ad3 a DSG2 estará también involucrada en la unión de otras especies B Ads a DSG2. Cabe destacar, que mientras D261, F265, y E299 se conservan en los cuatro Ads que interaccionan con DSG2 (Ad3, 7, 11, 14), otros restos críticos (N186, V189, L296) difieren entre estos serotipos (Fig. 12).

Ad14 es un importante objeto de investigación debido a la reciente aparición de una nueva cepa (Ad14p1). Nunca antes documentado en los Estados Unidos, Ad14p1 se describió primero en Marzo y Abril de 2006 durante la vigilancia de rutina de varios centros de entrenamiento de reclutas militares en Estados Unidos (26). Durante Marzo-Junio del siguiente año, un total de 140 casos adicionales de enfermedad respiratoria HAdV-B14p1 confirmada se reportaron en pacientes en Oregón, Washington y Texas (3). El treinta y ocho por ciento de estos pacientes fueron hospitalizados, incluyendo un 17% que fueron ingresados en unidades de cuidados intensivos; 5% pacientes muertos. Brotes de HAdV-B14p1 se detectaron posteriormente en otras 5 bases y en poblaciones civiles en Washington (1), Oregón (23), Alaska (15), Wisconsin, y Pensilvania (10, 22) así como en Canadá (16), China (33) y Corea del Sur (34). En este punto, la base molecular para la alta patogenicidad y/o virulencia de Ad14p1 no está clara. Intentamos delinear los componentes estructurales para la unión de Ad14p1 a DSG2. La distribución de la hoja beta de Ad14p1 difiere de la de Ad3 (Fig. 1A). Por lo tanto, similar a los serotipos que interaccionan con CD46 (11, 12), es posible que Ads que interaccionan con DSG2 varíen en su estrategia de unión a DSG2, lo que podría dar como resultado diferentes áreas de unión en DSG2. Sin embargo, el cribado de una genoteca de mutantes de protuberancia de fibra Ad14p1 no soportaría esta hipótesis. Las áreas involucradas en la unión a DSG2 fueron esencialmente las mismas para las protuberancias de fibra Ad3 y Ad14p1. Sin embargo, nuestros hallazgos son relevantes para el tratamiento de la viremia Ad14p1, específicamente para la producción de inhibidores de Ad14p1 o señuelos de alta afinidad que puedan desencadenar la opsonización del virus presente en la circulación sanguínea o en las vías respiratorias.

Se ha reportado que, además de DSG2, Ad3 puede utilizar CD46 como un receptor para infectar células si no está DSG2 (35). Anteriormente, encontramos que células epiteliales normales polarizadas DSG2 están atrapadas en las uniones estrechas y no es accesible desde el lado apical, mientras que CD46 está presente en ambos lados de la membrana (42). Por lo tanto, nosotros especulamos que CD46 puede servir como un receptor de entrada relativamente ineficiente para Ad3, mientras que de novo produjo Ad3 y los pentones dodecaédricos de Ad3 interaccionan con DSG2, abren las uniones epiteliales y permiten la propagación lateral eficiente de Ad3 o la penetración en las capas más profundas del tejido y en la circulación sanguínea. La capacidad para realizar la ablación individualmente de los restos de protuberancias de Ad3 que son críticos para la unión a DSG2 y CD46, respectivamente, haría posible probar esta hipótesis.

Protuberancia de fibras con mayor afinidad. La mayoría de las mutaciones que aumentan la afinidad a DSG2 se localizan dentro del bucle EF, lo que indica que este bucle está involucrado en la estabilización de la interacción entre Ad3 y DSG2. Curiosamente, a diferencia de Ad7, 11, y 14, la protuberancia de fibra Ad3 tiene en esta área dos restos adicionales (VL) seguidos por una prolina. El bucle podría por tanto extenderse más allá y la prolina podría orientarlo de una manera que podría permitir una mejor interacción con el receptor. El análisis de la estructura 3D de uno de estos mutantes a nivel atómico soporta esta conclusión. Estos estudios indican que las mutaciones introducidas hacen el bucle más flexible, lo que debería facilitar la interacción con DSG2.

La identificación de las protuberancias de Ad3 con mayor afinidad que la protuberancia de wt Ad3 tiene implicaciones para la terapia génica mediada por Ad3. Recientemente, vectores de transferencia génica basados en Ad3 se han mostrado prometedores para la terapia del cáncer en ensayos clínicos (18). En teoría, los vectores Ad3 con mayor afinidad se podrían utilizar a dosis más bajas y competir con los anticuerpos de neutralización. Recientemente, se llevaron a cabo intentos para incorporar ligandos de alta afinidad en virus del sarampión (17) y vectores basados en Ad5 (3, 9, 45) para aumentar la eficacia y especificidad de la infección en las células diana *in vivo*. En base a nuestros hallazgos en este estudio, una estrategia similar puede perseguirse ahora para los vectores Ad3.

Además para mejorar los vectores Ad3, versiones de mayor afinidad de JO-1 tienen relevancia translacional. La mayoría de los tumores sólidos tienen origen epitelial y, aunque las células malignas son desdiferenciadas, mantienen las uniones intercelulares, una característica clave de las células epiteliales, tanto en tumores primarios como en lesiones metastáticas (5, 31). Estas uniones intercelulares representan un mecanismo de protección frente a los ataques por parte del sistema inmune del huésped y plantean barreras físicas que impiden la penetración intratumoral y la didusión de los agentes terapéuticos para el cáncer, incluyendo anticuerpos monoclonales y fármacos de quimioterapia (5, 31). Cuando se inyecta por vía intravenosa en ratones con xenoinjertos o tumores

transgénicos DSG2 singénicos, JO-1 mejoraron notablemente los efectos terapéuticos con una variedad de fármacos de quimioterapia así como anticuerpos monoclonales (5, 6). En este estudio, hemos mostrado que nuevas versiones de JO-1 con mayor afinidad (por ejemplo, JO-4) aumentaron la eficacia de los agentes terapéuticos del cáncer significativamente más que JO-1 (irinotecan, nab-paclitaxel, doxorubicina liposomal PEGilada, cetuximab) en cuatro modelos de tumores (A549, ove316, MDA-MB231, y TC1-DSG2). Los estudios de DSG2 en ratones transgénicos con tumores singénicos mostraron que los niveles de JO-4 en suero disminuían rápidamente debido más probablemente a la unión a DSG2 en tejidos. Estudios anteriores mostraron que, además de los tumores, linfocitos y plaquetas de hDSG2 transgénico expresa hDSG2 (similar a humanos y monos) (40, 42). A lo largo de esta línea hemos encontrado que la inyección de JO-4 dio como resultado una reducción transitoria de linfocitos y plaquetas.

A pesar de que aproximadamente un tercio de los humanos tienen anticuerpos neutralizantes frente a Ad3 (42), en un estudio reciente con suero de pacientes con cáncer de ovario encontramos anticuerpos detectables (unión) frente a JO-4 en sólo un 10% de los pacientes (N = 38) (Fig. 13). Sin embargo, es cierto que se desarrollarán en humanos respuestas inmunes adaptativas frente a JO-4 administrado por vía intravenosa, particularmente después de inyecciones repetidas. En este contexto, sin embargo es digno de mención que anticuerpos anti JO-4 generados después de la inyección en ratones inmunocompetentes parecían no inhibir críticamente la función de JO-4. Los datos mostrados en la Fig. 11C demuestran que JO-1 y JO-4 continúan siendo efectivos después de múltiples ciclos de tratamiento, incluso en presencia de anticuerpos detectables. Debido a que, el efecto terapéutico después de repetidas inyecciones fue significativamente mayor para JO-4, especulamos que JO-4 es más potente no sólo en la apertura de las uniones, sino también en la ruptura de los complejos entre el abridor de la unión y los anticuerpos del suero.

En resumen, nuestros estudios descubren importantes detalles estructurales de la unión de la protuberancia de fibra Ad3 y Ad14p1 a DSG2. Se muestra además una correlación entre la afinidad de las protuberancias de fibra Ad3 a DSG2 y los posteriores efectos sobre las uniones epiteliales. Finalmente, la generación de protuberancias de fibra Ad3 dimerica recombinante con mayor afinidad tiene implicaciones en la terapia del cáncer.

Referencias

2007. Acute respiratory disease associated with adenovirus serotype 14—four states, 2006-2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 56: 1181-1184.

Adams, P.D., P.V. Afonine, G. Bunkoczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. H. Headd, L. W. Hung, G. J. Kapral, R. W. Grosse-Kunstleve, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. Oeffner, R. J. Read, D. C. Richardson, J. S. Richardson, T. C. Terwilliger, and P. H. Zwart. 2010, PHENIX; a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66: 213-221.

Belousova, N., G. Mikheeva, J. Gelovani, and V. Krasnykh. 2008. Modification of adenovirus capsid with a designed protein ligand yields a gene vector targeted to a major molecular marker of cancer. *Journal of virology* 82:630-637.

Bewley, M. C., K. Springer, Y. B. Zhang, P. Freimuth, and J. M. Flanagan. 1999. Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR. *Science* 286:1579-1583.

Beyer, I., H. Cao, J. Persson, H. Song, M. Richter, Q. Feng, R. Yumul, R. van Rensburg, Z. Li, R. Berenson, D. Carter, S. Roffler, C. Drescher, and A. Lieber. 2012. Coadministration of epithelial junction opener JO-1 improves the efficacy and safety of chemotherapeutic drugs. *Clin Cancer Res* 18:3340-3351.

Beyer, I., R. van Rensburg, R. Strauss, Z. Li, H. Wang, J. Persson, R. Yumul, Q. Feng, H. Song, J. Bartek, P. Fender, and A. Lieber. 2011. Epithelial junction opener JO-1 improves monoclonal antibody therapy of cancer. *Cancer Res* 71:7080-7090.

Cadwell, R. C., and G. F. Joyce. 1994. Mutagenic PCR. *PCR Methods Appl* 3:S136-140.

Cadwell, R. C., and G. F. Joyce. 1992. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl* 2:28-33.

Campos, S. K., M. B. Parrott, and M. A. Barry. 2004. Avidin-based targeting and purification of a protein IX-modified, metabolically biotinylated adenoviral vector. *Mol Ther* 9:942-954.

Carr, M. J., A. E. Kajon, X. Lu, L. Dunford, P. O'Reilly, P. Holder, C. F. De Gascun, S. Coughlan, J. Connell, D. D. Erdman, and W. W. Hall. 2011. Deaths associated with human adenovirus-14p1 infections, Europe, 2009-2010. *Emerg Infect Dis* 17: 1402-1408.

Cupell, K., S. Muller, B. D. Persson, M. Jost, N. Arnberg, and T. Stehle. 2010. Structure of adenovirus type 21 knob in complex with CD46 reveals key differences in receptor contacts among species B adenoviruses. *J Virol* 84:3189-3200.

Cupelli, K., and T. Stehle. 2011. Viral attachment strategies: the many faces of adenoviruses. *Curr Opin Virol* 1:84-91.

- Durmort, C., C. Stechlin, G. Schochn, A. Mitraki, E Drouet, S. Cusack, and W. P. Burmeister. 2001. Structure of the fiber head of Ad3, a non-CAR-binding serotype of adenovirus. *Virology* 285:302-312.
- Emsley, P., B. Lohkamp, W. G. Scott, and K. Cowtan. 2010. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66:486-501.
- 5 Esposito, D. H., T. J. Gardner, E. Schneider, L. J. Stockman, J. E. Tate, C. A. Panozzo, C. L. Robbins, S. A. Jenkerson, L. Thomas, C. M. Watson, A. T. Curns, D. D. Erdman, X. Lu, T. Cromeans, M. Westcott, C. Humphries, J. Ballantyne, G. E. Fischer, J. B. McLaughlin, G. Armstrong, and L. J. Anderson. 2010. Outbreak of pneumonia associated with emergent human adenovirus serotype 14—Southeast Alaska, 2008, *J Infect Dis* 202:214-222.
- 10 Girouard, G., R. Garceau, L. Thibault, Y. Oussedik, N. Bastien, and Y. Li. 2013. Adenovirus serotype 14 infection, New Brunswick, Canada, 2011, *Emerg Infect Dis* 19:119-122.
- Hasegawa, K., C. Hu, T. Nakamura, J. D. Marks, S. J. Russell, and K. W. Peng. 2007. Affinity thresholds for membrane fusion triggering by viral glycoproteins. *Journal of virology* 81:13149-13157.
- 15 Hemminki, O., Diaconu, V. Cerullo, S. K. Pesonen, A. Kanerva, T. Joensuu, K. Kairemo, L. Laasonen, K. Partanen, L. Kangasniemi, A. Lieber, S. Pesonen, and A. Hemminki. 2012, Ad3-hTERT-EIA, a Fully Serotype 3 Oncolytic Adenovirus, in Patients With Chemotherapy Refractory Cancer. *Mol Ther* 20:1821-1830.
- Incardona, M. F., G. P. Bourenkov, K. Levik, R. A. Piertz, A. N. Popov, and O. Svensson. 2009, EDNA: a framework for plugin-based applications applied to X-ray experiment online data analysis. *J Synchrotron Radiat* 16:872-879.
- Kabsch, W. 2010. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66:133-144.
- 20 Kabsch, W. 2010. Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66:125-132.
- Kajon, A. E., X. Lu, D. D. Erdman, J. Louie, D. Schnurr, K. S. George, M. P. Koopmans, T. Alibhai, and D. Metzgar. 2010. Molecular epidemiology and brief history of emerging adenovirus 14-associated respiratory disease in the United States. *J Infect Dis* 202:93-103.
- 25 Lewis, P. F., M. A. Schmidt, X. Lu, D. D. Erdman, M. Campbell, A. Thomas, P. R. Cieslak, L. D. Grenz, L. Tsaknaris, C. Gleaves, B. Kendall, and D. Gilbert. 2009. A Community-based outbreak of severe respiratory illness caused by human adenovirus serotype 14. *J Infect Dis* 199:1427-1434.
- Louie, J. K., A. E. Kajon, M. Holodny L. Guardia-LaBar, B. Lee, A. M. Petru, J. K. Hacker, and D. P. Schnurr. 2008. Severe pneumonia due to adenovirus serotype 14: a new respiratory threat? *Clin Infect Dis* 46:421-425.
- 30 McCoy, A. J., R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, and R. J. Read. 2007. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 40:658-674.
- Metzgar, D., M. Osuna, A. E. Kajon, A. W. Hawksworth, M. Irvine, and K. L. Russell. 2007. Abrupt emergence of diverse species B adenoviruses at US military recruit training centers. *The Journal of infectious diseases* 196:1465-1473.
- 35 Pache, L., S. Venkataraman, G. R. Nemerow, and V. S. Reddy. 2008. Conservation of fiber structure and CD46 usage by subgroup B2 adenoviruses. *Virology* 375:573-579.
- Persson, B. D., D. M. Reiter, M. Marttila, Y. F. Mei, J. M. Casasnovas, N. Arnberg, and T. Stehle. 2007. Adenovirus type 11 binding alters the conformation of its receptor CD46. *Nat Struct Mol Biol* 14:164-166.
- Shayakhmetov, D. M., T. Papayannopoulou, G. Stamatoyannopoulos, and A. Lieber. 2000. Efficient gene transfer into human CD34(+) cells by a retargeted adenovirus vector. *J Virol* 74:2567-2583.
- 40 Strauss, R., Z. Y. Li, Y. Liu, I. Beyer, J. Persson, P. Sova, T. Moller, S. Pesonen, A. Hemminki, P. Hamerlik, C. Drescher, N. Urban, J. Bartek, and A. Lieber. 2011. Analysis of epithelial and mesenchymal markers in ovarian cancer reveals phenotypic heterogeneity and plasticity. *PLoS One* 6:e16186.
- Strauss, R., and A. Lieber. 2009. Anatomical and physical barriers to tumor targeting with oncolytic adenoviruses in vivo. *Curr Opin Mol Ther* 11:513-522.
- 45 Strauss, R., P. Sova, Y. Liu, Z. Y. Li, S. Tuve, D. Pritchard, P. Brinkkoetter, T. Moller, O. Wildner, S. Pesonen, A. Hemminki, N. Urban, C. Drescher, and A. Lieber. 2009. Epithelial phenotype of ovarian cancer mediates resistance to oncolytic adenoviruses. *Cancer Research* 15:5115-5125.
- Tang, L., J. An, Z. Xie, S. Dehghan, D. Seto, W. Xu, and Y. Ji. 2013. Genome and Bioinformatic Analysis of a HAdV-B14p1 Virus Isolated from a Baby with Pneumonia in Beijing, China. *PLoS One* 8:e60345.

- Trei, J. S., N. M. Johns, J. L. Garner, L. B. Noel, B. V. Ortman, K. L. Ens, M. C. Johns, M. L. Bunnin, and J. C. Gaydos. 2010. Spread of adenovirus to geographically dispersed military installations, May-October 2007. *Emerg Infect Dis* 16:769-775.
- 5 Trinh, H. V., G. Lesage, V. Chennampampil, B. Vollenweider, C. J. Burckhardt, S. Schauer, M. Havenga, U. F. Greber, and S. Hemmi. 2012. Avidity binding of human adenovirus serotypes 3 and 7 to the membrane cofactor CD46 triggers infection. *J Virol* 86:1623-1637.
- Tuve, S., B. M. Chen, Y. Liu, T. L. Cheng, P. Toure, P. S. Sow, Q. Feng, N. Kiviat, R. Strauss, S. Ni, Z. Y. Li, S. R. Roffler, and A. Lieber. 2007. Combination of tumor site-located CTL-associated antigen-4-blockade and systemic regulatory T-cell depletion induces tumor-destructive immune responses. *Cancer Res* 67:5929-5939.
- 10 Tuve, S., H. Wang, C. Ware, Y. Liu, A. Gaggar, K. Bernt, D. Shayakhmetov, Z. Li, R. Strauss, D. Stone, and A. Lieber. 2006. A new group B adenovirus receptor is expressed at high levels on human stem and tumor cells. *J Virol* 80:12109-12120.
- Ueno, N. T., and D. Zhang. 2011. Targeting EGFR in Triple Negative Breast Cancer. *J Cancer* 2:324-328.
- 15 Walters, R. W., P. Freimuth, T. O. Moninger, I. Ganske, J. Zabner, and M. J. Welsh. 2002. Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell* 110:789-799.
- Wang, H., I. Beyer, J. Persson, H. Song, Z. Li, M. Richter, H. Cao, R. van Rensburg, X. Yao, K. Hudkins, R. Yumul, X. B. Zhang, M. Yu, P. Fender, A. Hemminki, and A. Lieber. 2012. A new human DSG2-transgenic mouse model for studying the tropism and pathology of human adenoviruses. *J Virol* 86:6286-6302.
- 20 Wang, H., Z. Li, R. Yumul, S. Lara, A. Hemminki, P. Fender, and A. Lieber. 2011. Multimerization of adenovirus serotype 3 fiber knob domains is required for efficient binding of virus to desmoglein 2 and subsequent opening of epithelial junctions. *J Virol* 85:6390-6402.
- Wang, H., Z. Y. Li, Y. Liu, J. Persson, I. Beyer, T. Moller, D. Koyuncu, M. R. Drescher, R. Strauss, X. B. Zhang, J. K. Wahl, 3rd, N. Urban, C. Drescher, A. Hemminki, P. Fender, and A. Lieber. 2011. Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14. *Nat Med* 17:96-104.
- 25 Wang, H., Y. C. Liaw, D. Stone, O. Kalyuzhnyi, I. Amiraslanov, S. Tuve, C. L. Verlinde, D. Shayakhmetov, T. Stehle, S. Roffler, and A. Lieber. 2007. Identification of CD46 binding sites within the adenovirus serotype 35 fiber knob. *J Virol* 81:12785-12792.
- Wang, H., S. Tuve, D. D. Erdman, and A. Lieber. 2009. Receptor usage of a newly emergent adenovirus type 14. *Virology* 387:436-441.
- 30 Zeng, Y., M. Pinard, J. Jaime, L. Bourget, P. Uyen, M. D. O'Connor-McCourt, R. Gilbert, and B. Massie. 2008. A ligand-pseudoreceptor system based on the novo designed peptides for the generation of adenoviral vectors with altered tropism. *The journal of gene medicine* 10:355-367.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> University of Washington Center for Commercialization Lieber, Andre Wang, Hongjie
- 5 <120> Proteínas de unión a desmogleína 2 (DSG2) y usos para las mismas
<130> 13-1205-PCT2
- 10 <150> 61/954822
<151> 18-03-2014

<150> PCT/US2013/61431
<151> 24-09-2013
- 15 <160> 48

<170> PatentIn versión 3.5
- 20 <210> 1
<211> 195
<212> PRT
<213> Homo sapiens
- 25 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (6)..(6)
<223> X es V o P
- 30 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (7)..(7)
<223> X es N o K
- 35 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (9) .. (9)
<223> X es T o está ausente
- 40 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (10)..(10)
<223> X es E o R
- 45 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (14)..(14)
<223> X es Q o I
- 50 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (15)..(15)
<223> X es M o I
- 55 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (16)..(16)
<223> X es M o E
- 60 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (17)..(17)
<223> X es Y, A, N o D

<220>

- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (18)..(18)
<223> X es S o G
- 5 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (19)..(19)
<223> X es S o K
- 10 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (20)..(20)
<223> X es E o Q
- 15 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (21)..(21)
<223> X es S o N
- 20 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (22)..(22)
<223> X es P o N
- 25 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (24)..(24)
<223> X es C o S
- 30 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (27)..(27)
<223> X es T o I
- 35 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (29)..(29)
<223> X es I o T
- 40 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (33)..(33)
<223> X es N o T
- 45 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (35)..(35)
<223> X es A o G
- 50 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (36)..(36)
<223> X es L o I
- 55 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (38)..(38)
<223> X es T o N
- 60 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (39)..(39)
<223> X es A o G
- 65 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

- <222> (40)..(40)
<223> X es F o Y
- 5 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (42)..(42)
<223> X es Y o T
- 10 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (43)..(43)
<223> X es V o L.
- 15 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (44)..(44)
<223> X es I o M
- 20 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (46)..(46)
<223> X es V o A
- 25 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (48)..(48)
<223> X es N o D
- 30 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (49)..(49)
<223> X es N, Y o D
- 35 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (50)..(50)
<223> X es F o V
- 40 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (52)..(52)
<223> X es M o T
- 45 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (54)..(54)
<223> X es F o T
- 50 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (55)..(55)
<223> X es R o T
- 55 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (56)..(56)
<223> X es Y, H o N
- 60 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (57)..(57)
<223> X es R o K
- 65 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (59)..(59)

- <223> X es I o V
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
5 <222> (60)..(60)
<223> X es N o S
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
10 <222> (61)..(61)
<223> X es F o I
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
15 <222> (62)..(62)
<223> X es T o N
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
20 <222> (63)..(63)
<223> X es A o V
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
25 <222> (66)..(66)
<223> X es F o Y
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
30 <222> (69)..(69)
<223> X es S o A
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
35 <222> (70)..(70)
<223> X es T o A
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
40 <222> (72)..(72)
<223> X es N o H
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
45 <222> (73)..(73)
<223> X es L o I
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
50 <222> (75)..(75)
<223> X es T o P
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
55 <222> (76)..(76)
<223> X es S, R o D
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
60 <222> (77)..(77)
<223> X es S o L.
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
65 <222> (83)..(83)
<223> X es P o D

	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (85)..(85)
5	<223> X es N o E
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (86)..(86)
10	<223> X es H, L o P
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (87)..(87)
15	<223> X es K o E
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (88)..(88)
20	<223> X es S o Y
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (89)..(89)
25	<223> X es G o R
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (91)..(91)
30	<223> X es N o T
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (92)..(92)
35	<223> X es M o está ausente
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (93)..(93)
40	<223> X es A o está ausente
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (94)..(94)
45	<223> X es T o está ausente
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (95)..(95)
50	<223> X es G o está ausente
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (97)..(97)
55	<223> X es I, L o D
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (98)..(98)
60	<223> X es T, F, S, o L
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (99)..(99)
65	<223> X es N o S

	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (101)..(101)
5	<223> X es K o R
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (102)..(102)
10	<223> X es S o G
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (113)..(113)
15	<223> X es V, D o está ausente
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (114)..(114)
20	<223> X es L o está ausente
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (115)..(115)
25	<223> X es N o P
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (116)..(116)
30	<223> X es N, D o V
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (117)..(117)
35	<223> X es N o A
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (118)..(118)
40	<223> X es S o G
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (119)..(119)
45	<223> X es R o T
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (120)..(120)
50	<223> X es E o H
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (121)..(121)
55	<223> X es N, K o está ausente
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (122)..(122)
60	<223> X es E, G o está ausente
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (124)..(124)
65	<223> X es Y o F
	<220>

- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 - <222> (126)..(126)
 - <223> X es Y o F
- 5
 - <220>
 - <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 - <222> (128)..(128)
 - <223> X es T o Q
- 10
 - <220>
 - <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 - <222> (130)..(130)
 - <223> X es H o Y
- 15
 - <220>
 - <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 - <222> (132)..(132)
 - <223> X es T, Y o E
- 20
 - <220>
 - <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 - <222> (136)..(136)
 - <223> X es H, G o R
- 25
 - <220>
 - <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 - <222> (137)..(137)
 - <223> X es T o A
- 30
 - <220>
 - <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 - <222> (138)..(138)
 - <223> X es L o A
- 35
 - <220>
 - <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 - <222> (141)..(141)
 - <223> X es L o I
- 40
 - <220>
 - <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 - <222> (142)..(142)
 - <223> X es D o E
- 45
 - <220>
 - <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 - <222> (143)..(143)
 - <223> X es I o V
- 50
 - <220>
 - <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 - <222> (144)..(144)
 - <223> X es S o T
- 55
 - <220>
 - <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 - <222> (149)..(149)
 - <223> X es Q, R o K
- 60
 - <220>
 - <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 - <222> (151)..(151)
 - <223> X es A o L
- 65
 - <220>
 - <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

- <222> (152)..(152)
<223> X es I, P o L
- <220>
5 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (153)..(153)
<223> X es R, N o D
- <220>
10 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (154)..(154)
<223> X es A, N, S o D
- <220>
15 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (155)..(155)
<223> X es E, R o D
- <220>
20 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (159)..(159)
<223> X es C o V
- <220>
25 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (160)..(160)
<223> X es I o N
- <220>
30 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (161)..(161)
<223> X es R o T
- <220>
35 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (162)..(162)
<223> X es I, V o F
- <220>
40 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (163)..(163)
<223> X es T o L
- <220>
45 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (166)..(166)
<223> X es W o L
- <220>
50 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (167)..(167)
<223> X es N o S
- <220>
55 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA <222> (168)..(168)
<223> X es T o A
- <220>
60 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (170)..(170)
<223> X es D, L, o V
- <220>
65 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (174)..(174)
<223> X es G, V o está ausente

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (175)..(175)
 5 <223> X es Q o está ausente

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (177)..(177)
 10 <223> X es S o T

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (178)..(178)
 15 <223> X es A o Q

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (179)..(179)
 20 <223> X es A o T

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (182)..(182)
 25 <223> X es V o I

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (189)..(189)
 30 <223> X es Y o S

<400> 1
 Thr Leu Trp Thr Gly Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Ala Asn Cys Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

ES 2 638 320 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Lys Leu Xaa Leu Xaa Leu Val Lys
20 25 30

Xaa Gly Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Ser Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Asn Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu
50 55 60

Leu Xaa Phe Asp Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Ser Ser Leu
65 70 75 80

Lys Thr Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala
85 90 95

Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Phe Met Pro Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe
100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Ile Xaa Gly Xaa
115 120 125

Cys Xaa Tyr Xaa Ala Ser Asp Xaa Xaa Xaa Phe Pro Xaa Xaa Xaa Xaa
130 135 140

Val Met Leu Asn Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Ser Tyr Xaa Xaa
145 150 155 160

Xaa Xaa Xaa Trp Ser Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Ala Pro Glu Xaa Xaa Thr
165 170 175

Xaa Xaa Xaa Thr Leu Xaa Thr Ser Pro Phe Thr Phe Xaa Tyr Ile Arg
180 185 190

Glu Asp Asp
195

<210> 2
<211> 188
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
10 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (6)..(6)
<223> X es V o P

<220>
15 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (7)..(7)
<223> X es N o K

<220>
20 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (9) .. (9)
<223> X es E o R

<220>
25 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (13)..(13)

	<223> X es Q o I
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
5	<222> (14)..(14)
	<223> X es M o I
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
10	<222> (15)..(15)
	<223> X es M o E
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
15	<222> (16)..(16)
	<223> X es Y, A, N o D
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
20	<222> (17)..(17)
	<223> X es S o G
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
25	<222> (18)..(18)
	<223> X es S o K
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
30	<222> (19)..(19)
	<223> X es E o Q
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
35	<222> (20)..(20)
	<223> X es S o N
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
40	<222> (21)..(21)
	<223> X es P o N
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
45	<222> (23)..(23)
	<223> X es C o S
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
50	<222> (26)..(26)
	<223> X es I o T
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
55	<222> (28)..(28)
	<223> X es I o T
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
60	<222> (32)..(32)
	<223> X es N o T
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
65	<222> (34)..(34)
	<223> X es A o G

5	<220> <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA <222> (35)..(35) <223> X es L o I
10	<220> <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA <222> (37)..(37) <223> X es T o N
15	<220> <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA <222> (38)..(38) <223> X es A o G
20	<220> <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA <222> (39)..(39) <223> X es F o Y
25	<220> <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA <222> (41)..(41) <223> X es T o Y
30	<220> <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA <222> (42)..(42) <223> X es V o L.
35	<220> <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA <222> (43)..(43) <223> X es L o M
40	<220> <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA <222> (45)..(45) <223> X es V o A
45	<220> <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA <222> (47)..(47) <223> X es N o D
50	<220> <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA <222> (48)..(48) <223> X es H, Y o D
55	<220> <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA <222> (49)..(49) <223> X es F o V
60	<220> <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA <222> (51)..(51) <223> X es M o T
65	<220> <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA <222> (53)..(53) <223> X es F o T

	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (54)..(54)
	<223> X es R o T
5	
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (55)..(55)
	<223> X es Y, H o N
10	
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (56)..(56)
	<223> X es R o R
15	
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (58)..(58)
	<223> X es I o V
20	
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (59)..(59)
	<223> X es N o S
25	
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (60)..(60)
	<223> X es F o I
30	
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (61)..(61)
	<223> X es T o N
35	
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (62)..(62)
	<223> X es A o V
40	
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (65)..(65)
	<223> X es F o Y
45	
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (68)..(68)
	<223> X es S o A
50	
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (69)..(69)
	<223> X es T o A
55	
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (71)..(71)
	<223> X es N o H
60	
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (72)..(72)
	<223> X es L o I
65	
	<220>

- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (74)..(74)
- <223> X es T o P

- 5 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (75)..(75)
- <223> X es S, R o D

- 10 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (76)..(76)
- <223> X es L o S

- 15 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (82)..(82)
- <223> X es P o D

- 20 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (84)..(84)
- <223> X es N o E

- 25 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (85)..(85)
- <223> X es H, L o P

- 30 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (86)..(86)
- <223> X es R o E

- 35 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (87)..(87)
- <223> X es S o Y

- 40 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (88)..(88)
- <223> X es G o K

- 45 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (90)..(90)
- <223> X es N o T

- 50 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (92)..(92)
- <223> X es I, L o D

- 55 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (93)..(93)
- <223> X es T, F, S, o L

- 60 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (94)..(94)
- <223> X es N o S

- 65 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

- <222> (96)..(96)
<223> X es K o R
- <220>
5 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (97)..(97)
<223> X es S o G
- <220>
10 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (108)..(108)
<223> X es V, D o está ausente
- <220>
15 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (109)..(109)
<223> X es L o está ausente
- <220>
20 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (110)..(110)
<223> X es N o P
- <220>
25 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (111)..(111)
<223> X es N, D o V
- <220>
30 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (112)..(112)
<223> X es N o A
- <220>
35 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (113)..(113)
<223> X es S o G
- <220>
40 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (114)..(114)
<223> X es R o T
- <220>
45 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (115)..(115)
<223> X es E o H
- <220>
50 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (116)..(116)
<223> X es N, K o está ausente
- <220>
55 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (117)..(117)
<223> X es E, G o está ausente
- <220>
60 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (119)..(119)
<223> X es Y o F
- <220>
65 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (121)..(121)

	<223> X es Y o F
	<220>
5	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (123)..(123)
	<223> X es T o Q
	<220>
10	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (125)..(125)
	<223> X es H o Y
	<220>
15	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (127)..(127)
	<223> X es T, Y o E
	<220>
20	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (131)..(131)
	<223> X es H, G o R
	<220>
25	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (132)..(132)
	<223> X es T o A
	<220>
30	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (133)..(133)
	<223> X es L o A
	<220>
35	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (136)..(136)
	<223> X es L o I
	<220>
40	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (137)..(137)
	<223> X es D o E
	<220>
45	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (138)..(138)
	<223> X es I o V
	<220>
50	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (139)..(139)
	<223> X es S o T
	<220>
55	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (144)..(144)
	<223> X es Q, R o K
	<220>
60	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (146)..(146)
	<223> X es A o L
	<220>
65	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (147)..(147)
	<223> X es I, P o L

	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (148)..(148)
5	<223> X es R, N o D
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (149)..(149)
10	<223> X es A, S, N o D
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (150)..(150)
15	<223> X es D, E, o R
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (154)..(154)
20	<223> X es C o V
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (155)..(155)
25	<223> X es I o N
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (156)..(156)
30	<223> X es R o T
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (157)..(157)
35	<223> X es I, V o F
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (158)..(158)
40	<223> X es T o L
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (161)..(161)
45	<223> X es N o L
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (162)..(162)
50	<223> X es N o S
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (163)..(163)
55	<223> X es T o A
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (165)..(165)
60	<223> X es D, L o V
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (170)..(170)
65	<223> X es S o T

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (171)..(171)

<223> X es A o Q

5

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (172)..(172)

<223> X es A o T

10

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (175)..(175)

<223> X es V o l

15

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (182)..(182)

<223> X es Y o S

20

<400> 2

Thr	Leu	Trp	Thr	Gly	Xaa	Xaa	Pro	Xaa	Ala	Asn	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5					10					15	

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Asp	Xaa	Lys	Leu	Xaa	Leu	Xaa	Leu	Val	Lys	Xaa
			20					25					30		

Gly	Xaa	Xaa	Val	Xaa	Xaa	Xaa	Val	Xaa	Xaa	Xaa	Gly	Xaa	Ser	Xaa	Xaa
			35				40					45			

Xaa	Asn	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Asn	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Glu	Leu
	50					55					60				

Xaa	Phe	Asp	Xaa	Xaa	Gly	Xaa	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Ser	Ser	Leu	Lys
65					70				75						80

Thr	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Gln	Xaa	Ala	Xaa	Xaa	Xaa	Ala	Xaa
				85					90					95	

Xaa	Phe	Met	Pro	Ser	Thr	Thr	Ala	Tyr	Pro	Phe	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			100					105					110		

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Asn	Xaa	Ile	Xaa	Gly	Xaa	Cys	Xaa	Tyr	Xaa	Ala
			115				120					125			

Ser	Asp	Xaa	Xaa	Xaa	Phe	Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Val	Met	Leu	Asn	Xaa
130						135					140				

Arg	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Thr	Ser	Tyr	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Trp	Ser
145						150				155					160

Xaa	Xaa	Xaa	Gly	Xaa	Ala	Pro	Glu	Thr	Xaa	Xaa	Xaa	Thr	Leu	Xaa	Thr
				165					170					175	

Ser	Pro	Phe	Thr	Phe	Xaa	Tyr	Ile	Arg	Glu	Asp	Asp
			180					185			

25

<210> 3

<211> 188

- <212> PRT
<213> Homo sapiens
- 5 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (6)..(6)
<223> X es V o P
- 10 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (7)..(7)
<223> X es N o R
- 15 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (9) .. (9)
<223> X es E o R
- 20 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (13)..(13)
<223> X es Q o I
- 25 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (14)..(14)
<223> X es M o I
- 30 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (15)..(15)
<223> X es M o E
- 35 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (16)..(16)
<223> X es Y, A, N o D
- 40 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (17)..(17)
<223> X es S o G
- 45 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (18)..(18)
<223> X es S o K
- 50 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (19)..(19)
<223> X es E o Q
- 55 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (20)..(20)
<223> X es S o N
- 60 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (21)..(21)
<223> X es P o N
- 65 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (23)..(23)

	<223> X es C o S
	<220>
5	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (26)..(26)
	<223> X es I o T
	<220>
10	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (28)..(28)
	<223> X es I o T
	<220>
15	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (32)..(32)
	<223> X es N o T
	<220>
20	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (34)..(34)
	<223> X es A o G
	<220>
25	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (35)..(35)
	<223> X es L o I
	<220>
30	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (37)..(37)
	<223> X es T o N
	<220>
35	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (38)..(38)
	<223> X es A o G
	<220>
40	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (39)..(39)
	<223> X es F o Y
	<220>
45	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (41)..(41)
	<223> X es T o Y
	<220>
50	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (42)..(42)
	<223> X es V o L.
	<220>
55	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (43)..(43)
	<223> X es I o M
	<220>
60	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (45)..(45)
	<223> X es V o A
	<220>
65	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (47)..(47)
	<223> X es N o D

	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (48)..(48)
5	<223> X es H, Y o D
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (49)..(49)
10	<223> X es F o V
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (51)..(51)
15	<223> X es M o T
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (53)..(53)
20	<223> X es F o T
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (54)..(54)
25	<223> X es R o T
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (55)..(55)
30	<223> X es Y, H o N
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (56)..(56)
35	<223> X es R o K
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (58)..(58)
40	<223> X es I o V
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (59)..(59)
45	<223> X es N o S
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (60)..(60)
50	<223> X es F o I
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (61)..(61)
55	<223> X es T o N
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (62)..(62)
60	<223> X es A o V
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (65)..(65)
65	<223> X es F o Y

	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (68)..(68)
5	<223> X es A o S
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (69)..(69)
10	<223> X es A o T
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (71)..(71)
15	<223> X es N o H
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (72)..(72)
20	<223> X es L o I
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (74)..(74)
25	<223> X es T o P
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (75)..(75)
30	<223> X es S, R o D
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (76)..(76)
35	<223> X es L o S
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (82)..(82)
40	<223> X es P o D
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (84)..(84)
45	<223> X es N o E
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (85)..(85)
50	<223> X es H, L o P
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (86)..(86)
55	<223> X es R o E
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (87)..(87)
60	<223> X es S o Y
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (88)..(88)
65	<223> X es G o R
	<220>

- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (90)..(90)
<223> X es N o T
- 5 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (92)..(92)
<223> X es I, L o D
- 10 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (93)..(93)
<223> X es T, F, S, o L
- 15 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (94)..(94)
<223> X es N o S
- 20 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (96)..(96)
<223> X es R o R
- 25 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (97)..(97)
<223> X es S o G
- 30 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (108)..(108)
<223> X es V, D o está ausente
- 35 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (110)..(110)
<223> X es N o P
- 40 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (111)..(111)
<223> X es H, D o V
- 45 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (112)..(112)
<223> X es N o A
- 50 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (113)..(113)
<223> X es S o G
- 55 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (114)..(114)
<223> X es R o T
- 60 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (115)..(115)
<223> X es E o H
- 65 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

- <222> (116)..(116)
<223> X es N, K o está ausente
- <220>
5 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (117)..(117)
<223> X es E, G o está ausente
- <220>
10 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (119)..(119)
<223> X es Y o F
- <220>
15 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (121)..(121)
<223> X es Y o F
- <220>
20 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (123)..(123)
<223> X es T o Q
- <220>
25 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (125)..(125)
<223> X es Y o H
- <220>
30 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (127)..(127)
<223> X es T, K o E
- <220>
35 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (131)..(131)
<223> X es H, G o R
- <220>
40 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (132)..(132)
<223> X es T o A
- <220>
45 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (133)..(133)
<223> X es L o A
- <220>
50 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (136)..(136)
<223> X es L o I
- <220>
55 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (137)..(137)
<223> X ie D o E
- <220>
60 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (138)..(138)
<223> X es I o V
- <220>
65 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (139)..(139)

- <223> X es S o T
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
5 <222> (144)..(144)
<223> X es Q, R, o K
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
10 <222> (146)..(146)
<223> X es A o L
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
15 <222> (147)..(147)
<223> X es I, P o L
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
20 <222> (148)..(148)
<223> X es R, N o D
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
25 <222> (149)..(149)
<223> X es A, S, N o D
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
30 <222> (150)..(150)
<223> X es E, R o D
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
35 <222> (154)..(154)
<223> X es C o V
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
40 <222> (155)..(155)
<223> X es I o M
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
45 <222> (156)..(156)
<223> X es R o T
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
50 <222> (157)..(157)
<223> X es I, V o F
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
55 <222> (158)..(158)
<223> X es T o L
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
60 <222> (161)..(161)
<223> X es W o L
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
65 <222> (162)..(162)
<223> X es N o S

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (163)..(163)
 5 <223> X es T o A

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (165)..(165)
 10 <223> X es D, L o V

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (170)..(170)
 15 <223> X es S o T

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (171)..(171)
 20 <223> X es A o Q

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (172)..(172)
 25 <223> X es A o T

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (175)..(175)
 30 <223> X es V o I

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (182)..(182)
 35 <223> X es Y o S

<400> 3
 Thr Leu Trp Thr Gly Xaa Xaa Pro Xaa Ala Asn Cys Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Lys Leu Xaa Leu Xaa Leu Val Lys Xaa
 20 25 30
 Gly Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
 35 40 45
 Xaa Asn Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Leu
 50 55 60
 Xaa Phe Asp Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Ser Ser Leu Lys
 65 70 75 80
 Thr Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Ala Xaa
 85 90 95
 Xaa Phe Met Pro Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Xaa Leu Xaa Xaa Xaa
 100 105 110

ES 2 638 320 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Ile Xaa Gly Xaa Cys Xaa Tyr Xaa Ala
115 120 125

Ser Asp Xaa Xaa Xaa Phe Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Val Met Leu Asn Xaa
130 135 140

Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Ser Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Ser
145 150 155 160

Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Ala Pro Glu Thr Xaa Xaa Xaa Thr Leu Xaa Thr
165 170 175

Ser Pro Phe Thr Phe Xaa Tyr Ile Arg Glu Asp Asp
180 185

<210> 4
<211> 188
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
10 <222> (35)..(35)
<223> X es I o L

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
15 <222> (85)..(85)
<223> X es H, L o P

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
20 <222> (86)..(86)
<223> X es K o E

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
25 <222> (93)..(93)
<223> X es T, F, S o L

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
30 <222> (108)..(108)
<223> X es V, D o está ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
35 <222> (117)..(117)
<223> X es E, G o está ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
40 <222> (119)..(119)
<223> X es Y o F

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
45 <222> (127)..(127)
<223> X es T, K o E

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
50 <222> (162)..(162)

ES 2 638 320 T3

<223> X es N o S

<400> 4

Thr Leu Trp Thr Gly Pro Lys Pro Glu Ala Asn Cys Ile Ile Glu Tyr
1 5 10 15

Gly Lys Gln Asn Pro Asp Ser Lys Leu Thr Leu Ile Leu Val Lys Asn
20 25 30

Gly Gly Xaa Val Asn Gly Tyr Val Thr Leu Met Gly Ala Ser Asp Tyr
35 40 45

Val Asn Thr Leu Phe Lys Asn Lys Asn Val Ser Ile Asn Val Glu Leu
50 55 60

Tyr Phe Asp Ala Thr Gly His Ile Leu Pro Asp Ser Ser Ser Leu Lys
65 70 75 80

Thr Asp Leu Glu Xaa Xaa Tyr Lys Gln Thr Ala Asp Xaa Ser Ala Arg
85 90 95

Gly Phe Met Pro Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Xaa Leu Pro Asn Ala
100 105 110

Gly Thr His Asn Xaa Asn Xaa Ile Phe Gly Gln Cys Tyr Tyr Xaa Ala
115 120 125

Ser Asp Gly Ala Leu Phe Pro Leu Glu Val Thr Val Met Leu Asn Lys
130 135 140

Arg Leu Pro Asp Ser Arg Thr Ser Tyr Val Met Thr Phe Leu Trp Ser
145 150 155 160

Leu Xaa Ala Gly Leu Ala Pro Glu Thr Thr Gln Ala Thr Leu Ile Thr
165 170 175

Ser Pro Phe Thr Phe Ser Tyr Ile Arg Glu Asp Asp
180 185

5

<210> 5

<211> 188

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 5

ES 2 638 320 T3

Thr Leu Trp Thr Gly Pro Lys Pro Glu Ala Asn Cys Ile Ile Glu Tyr
1 5 10 15

Gly Lys Gln Asn Pro Asp Ser Lys Leu Thr Leu Ile Leu Val Lys Asn
20 25 30

Gly Gly Ile Val Asn Gly Tyr Val Thr Leu Met Gly Ala Ser Asp Tyr
35 40 45

Val Asn Thr Leu Phe Lys Asn Lys Asn Val Ser Ile Asn Val Glu Leu
50 55 60

Tyr Phe Asp Ala Thr Gly His Ile Leu Pro Asp Ser Ser Ser Leu Lys
65 70 75 80

Thr Asp Leu Glu Leu Lys Tyr Lys Gln Thr Ala Asp Phe Ser Ala Arg
85 90 95

Gly Phe Met Pro Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Val Leu Pro Asn Ala
100 105 110

Gly Thr His Asn Glu Asn Phe Ile Phe Gly Gln Cys Tyr Tyr Lys Ala
115 120 125

Ser Asp Gly Ala Leu Phe Pro Leu Glu Val Thr Val Met Leu Asn Lys
130 135 140

Arg Leu Pro Asp Ser Arg Thr Ser Tyr Val Met Thr Phe Leu Trp Ser
145 150 155 160

Leu Asn Ala Gly Leu Ala Pro Glu Thr Thr Gln Ala Thr Leu Ile Thr
165 170 175

Ser Pro Phe Thr Phe Ser Tyr Ile Arg Glu Asp Asp
180 185

<210> 6

<211> 188

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Thr Leu Trp Thr Gly Pro Lys Pro Glu Ala Asn Cys Ile Ile Glu Tyr
1 5 10 15

Gly Lys Gln Asn Pro Asp Ser Lys Leu Thr Leu Ile Leu Val Lys Asn

10

ES 2 638 320 T3

20

25

30

Gly Gly Ile Val Asn Gly Tyr Val Thr Leu Met Gly Ala Ser Asp Tyr
35 40 45

Val Asn Thr Leu Phe Lys Asn Lys Asn Val Ser Ile Asn Val Glu Leu
50 55 60

Tyr Phe Asp Ala Thr Gly His Ile Leu Pro Asp Ser Ser Ser Leu Lys
65 70 75 80

Thr Asp Leu Glu Leu Glu Tyr Lys Gln Thr Ala Asp Ser Ser Ala Arg
85 90 95

Gly Phe Met Pro Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Val Leu Pro Asn Ala
100 105 110

Gly Thr His Asn Glu Asn Tyr Ile Phe Gly Gln Cys Tyr Tyr Lys Ala
115 120 125

Ser Asp Gly Ala Leu Phe Pro Leu Glu Val Thr Val Met Leu Asn Lys
130 135 140

Arg Leu Pro Asp Ser Arg Thr Ser Tyr Val Met Thr Phe Leu Trp Ser
145 150 155 160

Leu Asn Ala Gly Leu Ala Pro Glu Thr Thr Gln Ala Thr Leu Ile Thr
165 170 175

Ser Pro Phe Thr Phe Ser Tyr Ile Arg Glu Asp Asp
180 185

<210> 7

<211> 188

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Thr Leu Trp Thr Gly Pro Lys Pro Glu Ala Asn Cys Ile Ile Glu Tyr
1 5 10 15

Gly Lys Gln Asn Pro Asp Ser Lys Leu Thr Leu Ile Leu Val Lys Asn
20 25 30

Gly Gly Ile Val Asn Gly Tyr Val Thr Leu Met Gly Ala Ser Asp Tyr
35 40 45

Val Asn Thr Leu Phe Lys Asn Lys Asn Val Ser Ile Asn Val Glu Leu

10

ES 2 638 320 T3

50

55

60

Tyr Phe Asp Ala Thr Gly His Ile Leu Pro Asp Ser Ser Ser Leu Lys
65 70 75 80

Thr Asp Leu Glu Leu Lys Tyr Lys Gln Thr Ala Asp Phe Ser Ala Arg
85 90 95

Gly Phe Met Pro Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Val Leu Pro Asn Ala
100 105 110

Gly Thr His Asn Glu Asn Tyr Ile Phe Gly Gln Cys Tyr Tyr Lys Ala
115 120 125

Ser Asp Gly Ala Leu Phe Pro Leu Glu Val Thr Val Met Leu Asn Lys
130 135 140

Arg Leu Pro Asp Ser Arg Thr Ser Tyr Val Met Thr Phe Leu Trp Ser
145 150 155 160

Leu Ser Ala Gly Leu Ala Pro Glu Thr Thr Gln Ala Thr Leu Ile Thr
165 170 175

Ser Pro Phe Thr Phe Ser Tyr Ile Arg Glu Asp Asp
180 185

<210> 8

<211> 188

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Thr Leu Trp Thr Gly Pro Lys Pro Glu Ala Asn Cys Ile Ile Glu Tyr
1 5 10 15

Gly Lys Gln Asn Pro Asp Ser Lys Leu Thr Leu Ile Leu Val Lys Asn
20 25 30

Gly Gly Ile Val Asn Gly Tyr Val Thr Leu Met Gly Ala Ser Asp Tyr
35 40 45

Val Asn Thr Leu Phe Lys Asn Lys Asn Val Ser Ile Asn Val Glu Leu
50 55 60

Tyr Phe Asp Ala Thr Gly His Ile Leu Pro Asp Ser Ser Ser Leu Lys
65 70 75 80

Thr Asp Leu Glu Leu Lys Tyr Lys Gln Thr Ala Asp Phe Ser Ala Arg

5

10

ES 2 638 320 T3

85 90 95

Gly Phe Met Pro Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Asp Leu Pro Asn Ala
100 105 110

Gly Thr His Asn Glu Asn Tyr Ile Phe Gly Gln Cys Tyr Tyr Lys Ala
115 120 125

Ser Asp Gly Ala Leu Phe Pro Leu Glu Val Thr Val Met Leu Asn Lys
130 135 140

Arg Leu Pro Asp Ser Arg Thr Ser Tyr Val Met Thr Phe Leu Trp Ser
145 150 155 160

Leu Asn Ala Gly Leu Ala Pro Glu Thr Thr Gln Ala Thr Leu Ile Thr
165 170 175

Ser Pro Phe Thr Phe Ser Tyr Ile Arg Glu Asp Asp
180 185

<210> 9
<211> 188
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Thr Leu Trp Thr Gly Pro Lys Pro Glu Ala Asn Cys Ile Ile Glu Tyr
1 5 10 15

Gly Lys Gln Asn Pro Asp Ser Lys Leu Thr Leu Ile Leu Val Lys Asn
20 25 30

Gly Gly Leu Val Asn Gly Tyr Val Thr Leu Met Gly Ala Ser Asp Tyr
35 40 45

Val Asn Thr Leu Phe Lys Asn Lys Asn Val Ser Ile Asn Val Glu Leu
50 55 60

Tyr Phe Asp Ala Thr Gly His Ile Leu Pro Asp Ser Ser Ser Leu Lys
65 70 75 80

Thr Asp Leu Glu Pro Lys Tyr Lys Gln Thr Ala Asp Phe Ser Ala Arg
85 90 95

Gly Phe Met Pro Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Val Leu Pro Asn Ala
100 105 110

Gly Thr His Asn Glu Asn Tyr Ile Phe Gly Gln Cys Tyr Tyr Glu Ala

ES 2 638 320 T3

115

120

125

Ser Asp Gly Ala Leu Phe Pro Leu Glu Val Thr Val Met Leu Asn Lys
130 135 140

Arg Leu Pro Asp Ser Arg Thr Ser Tyr Val Met Thr Phe Leu Trp Ser
145 150 155 160

Leu Asn Ala Gly Leu Ala Pro Glu Thr Thr Gln Ala Thr Leu Ile Thr
165 170 175

Ser Pro Phe Thr Phe Ser Tyr Ile Arg Glu Asp Asp
180 185

<210> 10

<211> 188

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Thr Leu Trp Thr Gly Pro Lys Pro Glu Ala Asn Cys Ile Ile Glu Tyr
1 5 10 15

Gly Lys Gln Asn Pro Asp Ser Lys Leu Thr Leu Ile Leu Val Lys Asn
20 25 30

Gly Gly Ile Val Asn Gly Tyr Val Thr Leu Met Gly Ala Ser Asp Tyr
35 40 45

Val Asn Thr Leu Phe Lys Asn Lys Asn Val Ser Ile Asn Val Glu Leu
50 55 60

Tyr Phe Asp Ala Thr Gly His Ile Leu Pro Asp Ser Ser Ser Leu Lys
65 70 75 80

Thr Asp Leu Glu Leu Lys Tyr Lys Gln Thr Ala Asp Leu Ser Ala Arg
85 90 95

Gly Phe Met Pro Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Val Leu Pro Asn Ala
100 105 110

Gly Thr His Asn Glu Asn Tyr Ile Phe Gly Gln Cys Tyr Tyr Lys Ala
115 120 125

Ser Asp Gly Ala Leu Phe Pro Leu Glu Val Thr Val Met Leu Asn Lys
130 135 140

Arg Leu Pro Asp Ser Arg Thr Ser Tyr Val Met Thr Phe Leu Trp Ser
145 150 155 160

Leu Asn Ala Gly Leu Ala Pro Glu Thr Thr Gln Ala Thr Leu Ile Thr
165 170 175

Ser Pro Phe Thr Phe Ser Tyr Ile Arg Glu Asp Asp
180 185

<210> 11
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 11
 Thr Leu Trp Thr Gly Pro Lys Pro Glu Ala Asn Cys Ile Ile Glu Tyr
 1 5 10 15
 Gly Lys Gln Asn Pro Asp Ser Lys Leu Thr Leu Ile Leu Val Lys Asn
 20 25 30
 Gly Gly Ile Val Asn Gly Tyr Val Thr Leu Met Gly Ala Ser Asp Tyr
 35 40 45
 Val Asn Thr Leu Phe Lys Asn Lys Asn Val Ser Ile Asn Val Glu Leu
 50 55 60
 Tyr Phe Asp Ala Thr Gly His Ile Leu Pro Asp Ser Ser Ser Leu Lys
 65 70 75 80
 Thr Asp Leu Glu Leu Lys Tyr Lys Gln Thr Ala Asp Phe Ser Ala Arg
 85 90 95
 Gly Phe Met Pro Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Val Leu Pro Asn Ala
 100 105 110
 Gly Thr His Asn Gly Asn Tyr Ile Phe Gly Gln Cys Tyr Tyr Glu Ala
 115 120 125
 Ser Asp Gly Ala Leu Phe Pro Leu Glu Val Thr Val Met Leu Asn Lys
 130 135 140
 Arg Leu Pro Asp Ser Arg Thr Ser Tyr Val Met Thr Phe Leu Trp Ser
 145 150 155 160
 Leu Asn Ala Gly Leu Ala Pro Glu Thr Thr Gln Ala Thr Leu Ile Thr
 165 170 175

Ser Pro Phe Thr Phe Ser Tyr Ile Arg Glu Asp Asp

10 180 185

<210> 12
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (4)..(4)
 <223> X es T o S

20

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (8)..(8)
 <223> X es L o V

25

	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (9) .. (9)
5	<223> X es T o N
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (14) .. (14)
10	<223> X es T o A
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (15) .. (15)
15	<223> X es G o S
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (24) .. (24)
20	<223> X es G o S
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (30) .. (30)
25	<223> X es D o T
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (32) .. (32)
30	<223> X es D o N
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (34) .. (34)
35	<223> X es T, F o S
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (36) .. (36)
40	<223> X es Q, K o E
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (40) .. (40)
45	<223> X es G, T o S
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (41) .. (41)
50	<223> X es A o V
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (42) .. (42)
55	<223> X es T o N
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (46) .. (46)
60	<223> X es T o V
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (48) .. (48)
65	<223> X es T o S

	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (49)..(49)
	<223> X es G o N
5	
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (53)..(53)
	<223> X es G o N
10	
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (55)..(55)
	<223> X es S o P
15	
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (56)..(56)
	<223> X es L o I
20	
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (58)..(58)
	<223> X es A, P o N
25	
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (61)..(61)
	<223> X es G o Q
30	
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (62)..(62)
	<223> X es T o I
35	
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (63)..(63)
	<223> X es D o E
40	
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (64)..(64)
	<223> X es Q o E
45	
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (69)..(69)
	<223> X es T, S o A
50	
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (73)..(73)
	<223> X es E, Q o N
55	
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (78)..(78)
	<223> X es N o D
60	
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (80)..(80)
	<223> X es N o S
65	
	<220>

- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (82)..(82)
 <223> X es l o S
- 5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (83)..(83)
 <223> X es l o C
- 10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (84)..(84)
 <223> X es l o A
- 15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (85)..(85)
 <223> X es D, N o L
- 20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (86)..(86)
 <223> X es D o R
- 25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (88)..(88)
 <223> X es l o está ausente
- 30 <400> 12
 Gly Val Leu Xaa Leu Lys Cys Xaa Xaa Pro Leu Thr Thr Xaa Xaa Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Gln Leu Lys Val Gly Xaa Gly Leu Thr Val Asp Xaa Thr Xaa
 20 25 30
 Gly Xaa Leu Xaa Glu Asn Ile Xaa Xaa Xaa Thr Pro Leu Xaa Lys Xaa
 35 40 45
 Xaa His Ser Ile Xaa Leu Xaa Xaa Gly Xaa Gly Leu Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Asn Lys Leu Cys Xaa Lys Leu Gly Xaa Gly Leu Thr Phe Xaa Ser Xaa
 65 70 75 80
 Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Asn Thr Leu
 85 90
- 35 <210> 13
 <400> 13
 000
- 40 <210> 14
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- 45 <400> 14

ES 2 638 320 T3

Asn Gly Val Leu Ser Leu Lys Cys Val Asn Pro Leu Thr Thr Ala Ser
1 5 10 15

Gly Ser Leu Gln Leu Lys Val Gly Ser Gly Leu Thr Val Asp Thr Thr
20 25 30

Asp Gly Ser Leu Glu Glu Asn Ile Lys Val Asn Thr Pro Leu Thr Lys
35 40 45

Ser Asn His Ser Ile Asn Leu Pro Ile Gly Asn Gly Leu Gln Ile Glu
50 55 60

Gln Asn Lys Leu Cys Ser Lys Leu Gly Asn Gly Leu Thr Phe Asp Ser
65 70 75 80

Ser Asn Ser Ile Ala Leu Lys Asn Asn Thr Leu
85 90

<210> 15

<211> 92

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Asp Gly Val Leu Thr Leu Lys Cys Leu Thr Pro Leu Thr Thr Thr Gly
1 5 10 15

10 Gly Ser Leu Gln Leu Lys Val Gly Gly Gly Leu Thr Ile Asp Asp Thr
20 25 30

Asp Gly Phe Leu Lys Glu Asn Ile Ser Ala Thr Thr Pro Leu Val Lys
35 40 45

Thr Gly His Ser Ile Gly Leu Ser Leu Gly Pro Gly Leu Gly Thr Asn
50 55 60

Glu Asn Lys Leu Cys Ala Lys Leu Gly Glu Gly Leu Thr Phe Asn Ser
65 70 75 80

Asn Asn Ile Cys Ile Asn Asp Asn Ile Asn Thr Leu
85 90

<210> 16

<211> 92

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

ES 2 638 320 T3

Asn Gly Val Leu Thr Leu Lys Cys Leu Thr Pro Leu Thr Thr Thr Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Gln Leu Lys Val Gly Gly Gly Leu Thr Val Asp Asp Thr
20 25 30

Asn Gly Phe Leu Lys Glu Asn Ile Ser Ala Thr Thr Pro Leu Val Lys
35 40 45

Thr Gly His Ser Ile Gly Leu Pro Leu Gly Ala Gly Leu Gly Thr Asn
50 55 60

Glu Asn Lys Leu Cys Ile Lys Leu Gly Gln Gly Leu Thr Phe Asn Ser
65 70 75 80

Asn Asn Ile Cys Ile Asp Asp Asn Ile Asn Thr Leu
85 90

<210> 17

<211> 91

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Gly Val Leu Thr Leu Lys Cys Leu Thr Pro Leu Thr Thr Thr Gly Gly
1 5 10 15

10

Ser Leu Gln Leu Lys Val Gly Gly Gly Leu Thr Val Asp Asp Thr Asp
20 25 30

Gly Thr Leu Gln Glu Asn Ile Gly Ala Thr Thr Pro Leu Val Lys Thr
35 40 45

Gly His Ser Ile Gly Leu Ser Leu Gly Ala Gly Leu Gly Thr Asp Glu
50 55 60

Asn Lys Leu Cys Thr Lys Leu Gly Glu Gly Leu Thr Phe Asn Ser Asn
65 70 75 80

Asn Ile Cys Ile Asp Asp Asn Ile Asn Thr Leu
85 90

<210> 18

<211> 92

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

ES 2 638 320 T3

Asp Gly Val Leu Thr Leu Lys Cys Leu Thr Pro Leu Thr Thr Thr Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Gln Leu Lys Val Gly Gly Gly Leu Thr Val Asp Asp Thr
20 25 30

Asp Gly Thr Leu Gln Glu Asn Ile Gly Ala Thr Thr Pro Leu Val Lys
35 40 45

Thr Gly His Ser Ile Gly Leu Ser Leu Gly Ala Gly Leu Gly Thr Asp
50 55 60

Glu Asn Lys Leu Cys Thr Lys Leu Gly Glu Gly Leu Thr Phe Asn Ser
65 70 75 80

Asn Asn Ile Cys Ile Asp Asp Asn Ile Asn Thr Leu
85 90

<210> 19

<211> 16

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Asp Phe Leu Val Ile Tyr Ile Glu Glu Ala His Ala Ser Asp Gly Trp
1 5 10 15

10

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 20

Ala Asp Phe Leu Tyr Ile Glu Ala His Asp Gly Trp
1 5 10

<210> 21

20

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Gln Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys
1 5 10 15

Thr Leu Arg Ala
20

25

<210> 22

<211> 25

<212> PRT

30

<213> Homo sapiens

<400> 22

His Met Lys Gln Leu Asp Val Glu Glu Leu Ser Asn Tyr His Leu Asn
1 5 10 15

Val Ala Arg Leu Lys Val Gly Glu Arg
20 25

35

<210> 23

<211> 33

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
Gly Val Thr Gln Leu Met Arg Glu Met Leu Gln Leu Ile Lys Phe Gln
1 5 10 15

Phe Ser Leu Asn Tyr Gln Glu Glu Ser Leu Ser Tyr Gln Arg Leu Val
20 25 30

5 Thr

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens

<400> 24
Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys
1 5

15 <210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 25
Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu
1 5

<210> 26
<211> 4
25 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintético

30 <400> 26
Gly Gly Gly Ser
1

35 <210> 27
<211> 246
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

ES 2 638 320 T3

```

Met Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys
1          5          10          15

Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser
          20          25          30

Ala Leu Lys Glu Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
          35          40          45

Gly Ser Asn Ser Ile Ala Leu Lys Asn Asn Thr Leu Trp Thr Gly Pro
          50          55          60

Lys Pro Glu Ala Asn Cys Ile Ile Glu Tyr Gly Lys Gln Asn Pro Asp
65          70          75          80

Ser Lys Leu Thr Leu Ile Leu Val Lys Asn Gly Gly Ile Val Asn Gly
          85          90          95

Tyr Val Thr Leu Met Gly Ala Ser Asp Tyr Val Asn Thr Leu Phe Lys
          100          105          110

Asn Lys Asn Val Ser Ile Asn Val Glu Leu Tyr Phe Asp Ala Thr Gly
          115          120          125

His Ile Leu Pro Asp Ser Ser Ser Leu Lys Thr Asp Leu Glu Leu Lys
          130          135          140

Tyr Lys Gln Thr Ala Asp Phe Ser Ala Arg Gly Phe Met Pro Ser Thr
145          150          155          160

Thr Ala Tyr Pro Phe Val Leu Pro Asn Ala Gly Thr His Asn Glu Asn
          165          170          175

Tyr Ile Phe Gly Gln Cys Tyr Tyr Lys Ala Ser Asp Gly Ala Leu Phe
          180          185          190

Pro Leu Glu Val Thr Val Met Leu Asn Lys Arg Leu Pro Asp Ser Arg
          195          200          205

Thr Ser Tyr Val Met Thr Phe Leu Trp Ser Leu Asn Ala Gly Leu Ala
          210          215          220

Pro Glu Thr Thr Gln Ala Thr Leu Ile Thr Ser Pro Phe Thr Phe Ser
225          230          235          240

Tyr Ile Arg Glu Asp Asp
          245

```

5 <210> 28
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (1)..(1)

<223> Opcionalmente ausente

<400> 28

Met Gly Ser Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys
20 25 30

5 Val Ser Ala Leu Lys Glu Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
35 40 45

Gly Gly Gly Ser Asn Ser Ile Ala Leu Lys Asn Asn Thr Leu Trp Thr
50 55 60

Gly Pro Lys Pro Glu Ala Asn Cys Ile Ile Glu Tyr Gly Lys Gln Asn
65 70 75 80

Pro Asp Ser Lys Leu Thr Leu Ile Leu Val Lys Asn Gly Gly Ile Val
85 90 95

Asn Gly Tyr Val Thr Leu Met Gly Ala Ser Asp Tyr Val Asn Thr Leu
100 105 110

Phe Lys Asn Lys Asn Val Ser Ile Asn Val Glu Leu Tyr Phe Asp Ala
115 120 125

Thr Gly His Ile Leu Pro Asp Ser Ser Ser Leu Lys Thr Asp Leu Glu
130 135 140

Leu Lys Tyr Lys Gln Thr Ala Asp Phe Ser Ala Arg Gly Phe Met Pro
145 150 155 160

Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Val Leu Pro Asn Ala Gly Thr His Asn
165 170 175

Glu Asn Phe Ile Phe Gly Gln Cys Tyr Tyr Lys Ala Ser Asp Gly Ala
180 185 190

Leu Phe Pro Leu Glu Val Thr Val Met Leu Asn Lys Arg Leu Pro Asp
195 200 205

Ser Arg Thr Ser Tyr Val Met Thr Phe Leu Trp Ser Leu Asn Ala Gly
210 215 220

Leu Ala Pro Glu Thr Thr Gln Ala Thr Leu Ile Thr Ser Pro Phe Thr
225 230 235 240

Phe Ser Tyr Ile Arg Glu Asp Asp
245

<210> 29

<211> 248

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (1)..(1)

<223> Opcionalmente ausente

5

<400> 29

Met Gly Ser Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys
20 25 30

Val Ser Ala Leu Lys Glu Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
35 40 45

Gly Gly Gly Ser Asn Ser Ile Ala Leu Lys Asn Asn Thr Leu Trp Thr
50 55 60

Gly Pro Lys Pro Glu Ala Asn Cys Ile Ile Glu Tyr Gly Lys Gln Asn
65 70 75 80

Pro Asp Ser Lys Leu Thr Leu Ile Leu Val Lys Asn Gly Gly Ile Val
85 90 95

Asn Gly Tyr Val Thr Leu Met Gly Ala Ser Asp Tyr Val Asn Thr Leu
100 105 110

Phe Lys Asn Lys Asn Val Ser Ile Asn Val Glu Leu Tyr Phe Asp Ala
115 120 125

Thr Gly His Ile Leu Pro Asp Ser Ser Ser Leu Lys Thr Asp Leu Glu
130 135 140

Leu Glu Tyr Lys Gln Thr Ala Asp Ser Ser Ala Arg Gly Phe Met Pro
145 150 155 160

Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Val Leu Pro Asn Ala Gly Thr His Asn
165 170 175

Glu Asn Tyr Ile Phe Gly Gln Cys Tyr Tyr Lys Ala Ser Asp Gly Ala
180 185 190

Leu Phe Pro Leu Glu Val Thr Val Met Leu Asn Lys Arg Leu Pro Asp
195 200 205

Ser Arg Thr Ser Tyr Val Met Thr Phe Leu Trp Ser Leu Asn Ala Gly
210 215 220

Leu Ala Pro Glu Thr Thr Gln Ala Thr Leu Ile Thr Ser Pro Phe Thr
225 230 235 240

Phe Ser Tyr Ile Arg Glu Asp Asp
245

10

<210> 30

<211> 248

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

5 <222> (1)..(1)

<223> Opcionalmente ausente

<400> 30

Met Gly Ser Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys
20 25 30

Val Ser Ala Leu Lys Glu Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
35 40 45

Gly Gly Gly Ser Asn Ser Ile Ala Leu Lys Asn Asn Thr Leu Trp Thr
50 55 60

Gly Pro Lys Pro Glu Ala Asn Cys Ile Ile Glu Tyr Gly Lys Gln Asn
65 70 75 80

Pro Asp Ser Lys Leu Thr Leu Ile Leu Val Lys Asn Gly Gly Ile Val
85 90 95

Asn Gly Tyr Val Thr Leu Met Gly Ala Ser Asp Tyr Val Asn Thr Leu
100 105 110

Phe Lys Asn Lys Asn Val Ser Ile Asn Val Glu Leu Tyr Phe Asp Ala
115 120 125

Thr Gly His Ile Leu Pro Asp Ser Ser Ser Leu Lys Thr Asp Leu Glu
130 135 140

Leu Lys Tyr Lys Gln Thr Ala Asp Phe Ser Ala Arg Gly Phe Met Pro
145 150 155 160

Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Val Leu Pro Asn Ala Gly Thr His Asn
165 170 175

Glu Asn Tyr Ile Phe Gly Gln Cys Tyr Tyr Lys Ala Ser Asp Gly Ala
180 185 190

10

Leu Phe Pro Leu Glu Val Thr Val Met Leu Asn Lys Arg Leu Pro Asp
195 200 205

Ser Arg Thr Ser Tyr Val Met Thr Phe Leu Trp Ser Leu Ser Ala Gly
210 215 220

Leu Ala Pro Glu Thr Thr Gln Ala Thr Leu Ile Thr Ser Pro Phe Thr
225 230 235 240

Phe Ser Tyr Ile Arg Glu Asp Asp
245

<210> 31

<211> 248
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> Opcionalmente ausente

10 <400> 31
 Met Gly Ser Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys
 20 25 30
 Val Ser Ala Leu Lys Glu Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 35 40 45
 Gly Gly Gly Ser Asn Ser Ile Ala Leu Lys Asn Asn Thr Leu Trp Thr
 50 55 60
 Gly Pro Lys Pro Glu Ala Asn Cys Ile Ile Glu Tyr Gly Lys Gln Asn
 65 70 75 80
 Pro Asp Ser Lys Leu Thr Leu Ile Leu Val Lys Asn Gly Gly Ile Val
 85 90 95
 Asn Gly Tyr Val Thr Leu Met Gly Ala Ser Asp Tyr Val Asn Thr Leu
 100 105 110
 Phe Lys Asn Lys Asn Val Ser Ile Asn Val Glu Leu Tyr Phe Asp Ala
 115 120 125
 Thr Gly His Ile Leu Pro Asp Ser Ser Ser Leu Lys Thr Asp Leu Glu
 130 135 140
 Leu Lys Tyr Lys Gln Thr Ala Asp Phe Ser Ala Arg Gly Phe Met Pro
 145 150 155 160
 Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Asp Leu Pro Asn Ala Gly Thr His Asn
 165 170 175
 Glu Asn Tyr Ile Phe Gly Gln Cys Tyr Tyr Lys Ala Ser Asp Gly Ala
 180 185 190
 Leu Phe Pro Leu Glu Val Thr Val Met Leu Asn Lys Arg Leu Pro Asp
 195 200 205
 Ser Arg Thr Ser Tyr Val Met Thr Phe Leu Trp Ser Leu Asn Ala Gly
 210 215 220
 Leu Ala Pro Glu Thr Thr Gln Ala Thr Leu Ile Thr Ser Pro Phe Thr
 225 230 235 240
 Phe Ser Tyr Ile Arg Glu Asp Asp
 245

<210> 32
 <211> 248
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 10 <223> Opcionalmente ausente

 <400> 32
 Met Gly Ser Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys
 1 5 10 15

 Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys
 20 25 30

 Val Ser Ala Leu Lys Glu Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 35 40 45

 Gly Gly Gly Ser Asn Ser Ile Ala Leu Lys Asn Asn Thr Leu Trp Thr
 50 55 60

 Gly Pro Lys Pro Glu Ala Asn Cys Ile Ile Glu Tyr Gly Lys Gln Asn
 65 70 75 80

ES 2 638 320 T3

Pro Asp Ser Lys Leu Thr Leu Ile Leu Val Lys Asn Gly Gly Leu Val
85 90 95

Asn Gly Tyr Val Thr Leu Met Gly Ala Ser Asp Tyr Val Asn Thr Leu
100 105 110

Phe Lys Asn Lys Asn Val Ser Ile Asn Val Glu Leu Tyr Phe Asp Ala
115 120 125

Thr Gly His Ile Leu Pro Asp Ser Ser Ser Leu Lys Thr Asp Leu Glu
130 135 140

Pro Lys Tyr Lys Gln Thr Ala Asp Phe Ser Ala Arg Gly Phe Met Pro
145 150 155 160

Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Val Leu Pro Asn Ala Gly Thr His Asn
165 170 175

Glu Asn Tyr Ile Phe Gly Gln Cys Tyr Tyr Glu Ala Ser Asp Gly Ala
180 185 190

Leu Phe Pro Leu Glu Val Thr Val Met Leu Asn Lys Arg Leu Pro Asp
195 200 205

Ser Arg Thr Ser Tyr Val Met Thr Phe Leu Trp Ser Leu Asn Ala Gly
210 215 220

Leu Ala Pro Glu Thr Thr Gln Ala Thr Leu Ile Thr Ser Pro Phe Thr
225 230 235 240

Phe Ser Tyr Ile Arg Glu Asp Asp
245

<210> 33

<211> 248

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

10 <222> (1)..(1)

<223> Opcionalmente ausente

<400> 33

Met Gly Ser Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys
1 5 10 15

15

ES 2 638 320 T3

Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys
 20 25 30
 Val Ser Ala Leu Lys Glu Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 35 40 45
 Gly Gly Gly Ser Asn Ser Ile Ala Leu Lys Asn Asn Thr Leu Trp Thr
 50 55 60
 Gly Pro Lys Pro Glu Ala Asn Cys Ile Ile Glu Tyr Gly Lys Gln Asn
 65 70 75 80
 Pro Asp Ser Lys Leu Thr Leu Ile Leu Val Lys Asn Gly Gly Ile Val
 85 90 95
 Asn Gly Tyr Val Thr Leu Met Gly Ala Ser Asp Tyr Val Asn Thr Leu
 100 105 110
 Phe Lys Asn Lys Asn Val Ser Ile Asn Val Glu Leu Tyr Phe Asp Ala
 115 120 125
 Thr Gly His Ile Leu Pro Asp Ser Ser Ser Leu Lys Thr Asp Leu Glu
 130 135 140
 Leu Lys Tyr Lys Gln Thr Ala Asp Leu Ser Ala Arg Gly Phe Met Pro
 145 150 155 160
 Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Val Leu Pro Asn Ala Gly Thr His Asn
 165 170 175
 Glu Asn Tyr Ile Phe Gly Gln Cys Tyr Tyr Lys Ala Ser Asp Gly Ala
 180 185 190
 Leu Phe Pro Leu Glu Val Thr Val Met Leu Asn Lys Arg Leu Pro Asp
 195 200 205
 Ser Arg Thr Ser Tyr Val Met Thr Phe Leu Trp Ser Leu Asn Ala Gly
 210 215 220
 Leu Ala Pro Glu Thr Thr Gln Ala Thr Leu Ile Thr Ser Pro Phe Thr
 225 230 235 240
 Phe Ser Tyr Ile Arg Glu Asp Asp
 245

<210> 34

<211> 248

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

10 <222> (1)..(1)

<223> Opcionalmente ausente

<400> 34

ES 2 638 320 T3

```

Met Gly Ser Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys
1          5          10          15

Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys
20          25          30

Val Ser Ala Leu Lys Glu Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
35          40          45

Gly Gly Gly Ser Asn Ser Ile Ala Leu Lys Asn Asn Thr Leu Trp Thr
50          55          60

Gly Pro Lys Pro Glu Ala Asn Cys Ile Ile Glu Tyr Gly Lys Gln Asn
65          70          75          80

Pro Asp Ser Lys Leu Thr Leu Ile Leu Val Lys Asn Gly Gly Ile Val
85          90          95

Asn Gly Tyr Val Thr Leu Met Gly Ala Ser Asp Tyr Val Asn Thr Leu
100         105         110

Phe Lys Asn Lys Asn Val Ser Ile Asn Val Glu Leu Tyr Phe Asp Ala
115         120         125

Thr Gly His Ile Leu Pro Asp Ser Ser Ser Leu Lys Thr Asp Leu Glu
130         135         140

Leu Lys Tyr Lys Gln Thr Ala Asp Phe Ser Ala Arg Gly Phe Met Pro
145         150         155         160

Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Val Leu Pro Asn Ala Gly Thr His Asn
165         170         175

Gly Asn Tyr Ile Phe Gly Gln Cys Tyr Tyr Glu Ala Ser Asp Gly Ala
180         185         190

Leu Phe Pro Leu Glu Val Thr Val Met Leu Asn Lys Arg Leu Pro Asp
195         200         205

Ser Arg Thr Ser Tyr Val Met Thr Phe Leu Trp Ser Leu Asn Ala Gly
210         215         220

Leu Ala Pro Glu Thr Thr Gln Ala Thr Leu Ile Thr Ser Pro Phe Thr
225         230         235         240

Phe Ser Tyr Ile Arg Glu Asp Asp
245

```

5 <210> 35
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Sintético

	<400> 35		
	atcacggatc cggtaggcggg tctggcgggt gctccgggtg cggttctaac aaactttgca	60	
	gtaaaactc	68	
5	<210> 36 <211> 39 <212> DNA <213> Secuencia Artificial		
10	<220> <223> Sintético		
	<400> 36		
15	ctcagctaataagcttagt catcttctct aatatagga	39	
	<210> 37 <211> 41 <212> DNA <213> Secuencia Artificial		
20	<220> <223> Sintético		
	<400> 37		
25	ccaattctat tgcacttaag aataacactt tatggacagg t	41	
	<210> 38 <211> 34 <212> DNA <213> Secuencia Artificial		
30	<220> <223> Sintético		
	<400> 38		
35	gtccaagctc agctaattaa gcttagtcat cttc	34	
	<210> 39 <211> 77 <212> DNA <213> Secuencia Artificial		
40	<220> <223> Sintético		
	<400> 39		
45	catcacggat ccggtggcgg ttctggcggg ggctccgggt gcggttctaa taaactttgt	60	
	accaaattgg gagaagg	77	
	<210> 40 <211> 40 <212> DNA <213> Secuencia Artificial		
50	<220> <223> Sintético		
	<400> 40		
55	gctaattaag ctagtcgtc ttctctgatg tagtaaaagg	40	
60	<210> 41 <211> 26 <212> DNA		

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintético

5 <400> 41
aacaccctgt ggacaggagt taaccc 26

10 <210> 42
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Sintético

<400> 42
ctcagctaataa taagcttagt cgta 24

20 <210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <400> 43
Asn Ser Ile Ala Leu Lys Asn Asn Thr Leu
1 5 10

30 <210> 44
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44
Asn Ser Asn Asn Ile Cys Ile Asn Asp Asn Ile Asn Thr Leu
1 5 10

35 <210> 45
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40 <400> 45
Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr Leu
1 5 10 15

45 <210> 46
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46
Asn Ser Asn Asn Ile Cys Ile Asp Asp Asn Ile Asn Thr Leu
1 5 10

50 <210> 47
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

55 <400> 47
Asn Ser Asn Asn Ile Cys Ile Asp Asp Asn Ile Asn Thr Leu
1 5 10

60 <210> 48
<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

	Gly	Asp	Ile	Cys	Ile	Lys	Asp	Ser	Ile	Asn	Thr	Leu
5	1				5					10		

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de fibra AdB-2/3 recombinante, que comprende:

(a) uno o más motivos de dominio de eje de un polipéptido de fibra AdB-2/3;

(b) un dominio de protuberancia de un polipéptido de fibra AdB-2/3 unido operativamente a y localizado en C-terminal con relación a uno o más motivos de dominio de eje de un polipéptido de fibra AdB-2/3, en donde el dominio de protuberancia del polipéptido de fibra AdB-2/3 comprende el péptido de una cualquiera de SEC ID NOS: 1-11, en donde cuando el dominio de protuberancia del polipéptido de fibra AdB-2/3 comprende el péptido de uno cualquiera de SEC ID NOS:1-4, al menos uno de los siguientes sucesos es cierto:

X2 es P;

X3 es E;

X4 es S, o L;

X5 es D;

X6 es G;

X7 es F;

X8 es E; o

X9 es S; y

(c) uno o más de los dominios de dimerización no derivados de AdB-2/3 unidos operativamente y localizados en N-terminal con relación a uno o más motivos del dominio de eje del polipéptido de fibra AdB-2/3.

2. El polipéptido de fibra AdB-2/3 recombinante de la reivindicación 1, en donde el polipéptido de fibra AdB-2/3 no incluye un dominio de cola del polipéptido de fibra AdB-2/3, y/o en donde cada motivo del dominio de eje se selecciona del grupo que consiste en un motivo del dominio de eje del polipéptido de fibra Ad3, un motivo del dominio de eje del polipéptido de fibra Ad7, un motivo del dominio de eje del polipéptido de fibra Ad11, un motivo del dominio de eje del polipéptido de fibra Ad14, un motivo del dominio de eje del polipéptido de fibra Ad14a, y combinaciones de los mismos, y/o en donde el uno o más motivos del dominio de eje comprenden 1-22 motivos de dominio de eje.

3. El polipéptido de fibra AdB-2/3 recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde cada motivo del dominio de eje comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOS: 43-48.

4. El polipéptido de fibra AdB-2/3 recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

(a)

(M)GSKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEGSGGGSGGGSGGGSN
SIALKNNTLWTGPKPEANCIIEYGKQNPDSKLTLLVKNGGIVNGYVTLMGASDYV
NTLFKNKNVSINVELYFDATGHILPDSSSLKTDLELKYKQTADFSARGFMPSTTAY
PFVLPNAGTHNENFIFGQCYKASDGALFPLEVTVMLNKRLPDSRTSYVMFLWS
LNAGLAPETTQATLITSPFTFSYIREDD (SEQ ID NO: 28);

(b)

(M)GSKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEGSGGGSGGGSGGGSN
SIALKNNTLWTGPKPEANCIIEYGKQNPDSKLTLLVKNGGIVNGYVTLMGASDYV
NTLFKNKNVSINVELYFDATGHILPDSSSLKTDLELEYKQTADSSARGFMPSTTAY
PFVLPNAGTHNENYIFGQCYKASDGALFPLEVTVMLNKRLPDSRTSYVMFLWS
LNAGLAPETTQATLITSPFTFSYIREDD (SEQ ID NO: 29);

(c)
(M/-)GSKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEGSGGGSGGGSGGG
NSIALKNNTLWTGPKPEANCIIEYGKQNPDSKLTLLLVKNGGIVNGYVTLMGASDY
VNTLFKNKNVSINVELYFDATGHILPDSSSLKTDLELKYKQTADFSARGFMPSTTA
YPFVLPNAGTHNENYIFGQCYYKASDGALFPLEVTVMLNKRLPDSRTSYVMFTLW
SLSAGLAPETTQATLITSPFTFSYIREDD (SEQ ID NO: 30);

(d)
(M/-)GSKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEGSGGGSGGGSGGG
NSIALKNNTLWTGPKPEANCIIEYGKQNPDSKLTLLLVKNGGIVNGYVTLMGASDY
VNTLFKNKNVSINVELYFDATGHILPDSSSLKTDLELKYKQTADFSARGFMPSTTA
YPFVLPNAGTHNENYIFGQCYYKASDGALFPLEVTVMLNKRLPDSRTSYVMFTLW
SLNAGLAPETTQATLITSPFTFSYIREDD (SEQ ID NO: 31);

(e)
(M/-)GSKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEGSGGGSGGGSGGG
NSIALKNNTLWTGPKPEANCIIEYGKQNPDSKLTLLLVKNGGLVNGYVTLMGASDY
VNTLFKNKNVSINVELYFDATGHILPDSSSLKTDLEPKYKQTADFSARGFMPSTTAY
PFVLPNAGTHNENYIFGQCYYEASDGALFPLEVTVMLNKRLPDSRTSYVMFTLWS
LNAGLAPETTQATLITSPFTFSYIREDD (SEQ ID NO: 32);

(f)
(M/-)GSKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEGSGGGSGGGSGGG
NSIALKNNTLWTGPKPEANCIIEYGKQNPDSKLTLLLVKNGGIVNGYVTLMGASDY
VNTLFKNKNVSINVELYFDATGHILPDSSSLKTDLELKYKQTADLSARGFMPSTTA
YPFVLPNAGTHNENYIFGQCYYKASDGALFPLEVTVMLNKRLPDSRTSYVMFTLW
SLNAGLAPETTQATLITSPFTFSYIREDD (SEQ ID NO: 33);

y
(g)
(M/-)GSKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEGSGGGSGGGSGGG
NSIALKNNTLWTGPKPEANCIIEYGKQNPDSKLTLLLVKNGGIVNGYVTLMGASDY
VNTLFKNKNVSINVELYFDATGHILPDSSSLKTDLELKYKQTADFSARGFMPSTTA
YPFVLPNAGTHNGNYIFGQCYYEASDGALFPLEVTVMLNKRLPDSRTSYVMFTLW
SLNAGLAPETTQATLITSPFTFSYIREDD (SEQ ID NO: 34).

- 15 5. El polipéptido de fibra AdB-2/3 recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el polipéptido de fibra AdB-2/3 contiene un solo motivo del dominio de eje del polipéptido de fibra AdB-2/3.
6. El polipéptido de fibra AdB-2/3 recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el polipéptido de fibra AdB-2/3 está multimerizado como un homotrímero.
- 20 7. El polipéptido de fibra AdB-2/3 recombinante de una cualquiera de la reivindicación 6, en donde el polipéptido de fibra AdB-2/3 es un dímero del homotrímero.
8. El polipéptido de fibra AdB-2/3 recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, que comprende además uno o más compuestos conjugados con el polipéptido de fibra AdB-2/3 recombinante seleccionado del grupo que consiste en agentes terapéuticos, de diagnóstico, y de formación de imágenes.
- 25 9. Un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido de fibra AdB-2/3 recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
10. Un vector de expresión recombinante que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 9.

11. Una célula huésped que comprende el vector de expresión recombinante de la reivindicación 10.
12. Una composición farmacéutica, que comprende el multímero de fibra AdB-2/3 de una cualquiera de las reivindicaciones 6-8; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 13. El multímero de fibra AdB-2/3 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, o la composición farmacéutica de la reivindicación 12 para su uso en la mejora de la eficacia de uno o más agentes terapéuticos en el tratamiento, o del diagnóstico en la diagnosis de un trastorno asociado con el tejido epitelial, y/o uno o más agentes de formación de imágenes en la formación de imágenes de los tejidos epiteliales.
- 10 14. El multímero de fibra AdB-2/3 para el uso de la reivindicación 13, en donde el trastorno asociado al tejido epitelial se selecciona de un grupo que consiste en tumores sólidos, síndrome del intestino irritable, trastorno inflamatorio intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, estreñimiento, enfermedad por reflujo gastroesofágico, esófago de Barrett, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, bronquitis, enfisema pulmonar, fibrosis quística, enfermedad pulmonar intersticial, neumonía, hipertensión pulmonar primaria, embolia pulmonar, sarcoidosis pulmonar, tuberculosis, pancreatitis, trastornos del conducto pancreático, obstrucción del conducto biliar, colecistitis, coledocolitiasis, trastorno cerebral, soriasis, dermatitis, glomerulonefritis, hepatitis, diabetes, trastornos del tiroides, celulitis, infección, pielonefritis, y cálculos biliares.
- 15 15. El multímero de fibra AdB-2/3 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, o la composición farmacéutica de la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento de un trastorno asociado con el tejido epitelial.

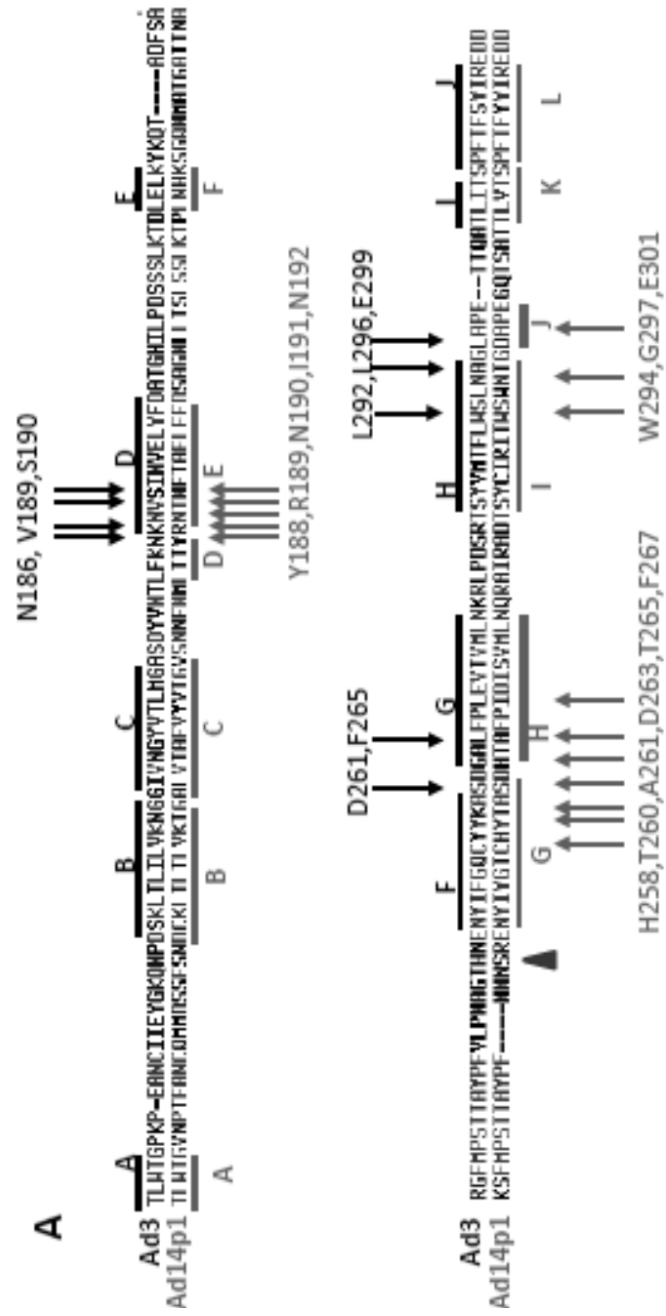
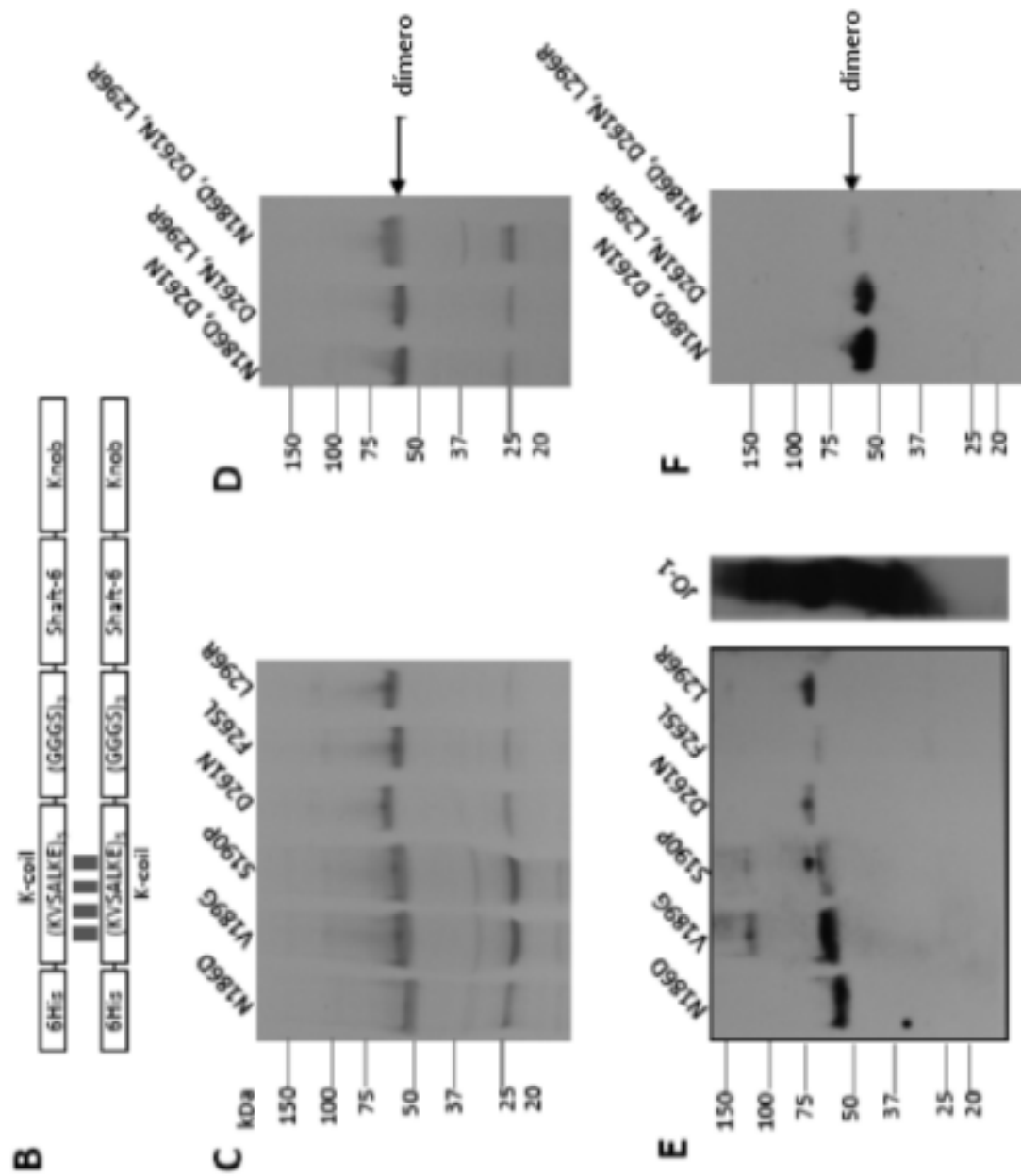


Figura 1a



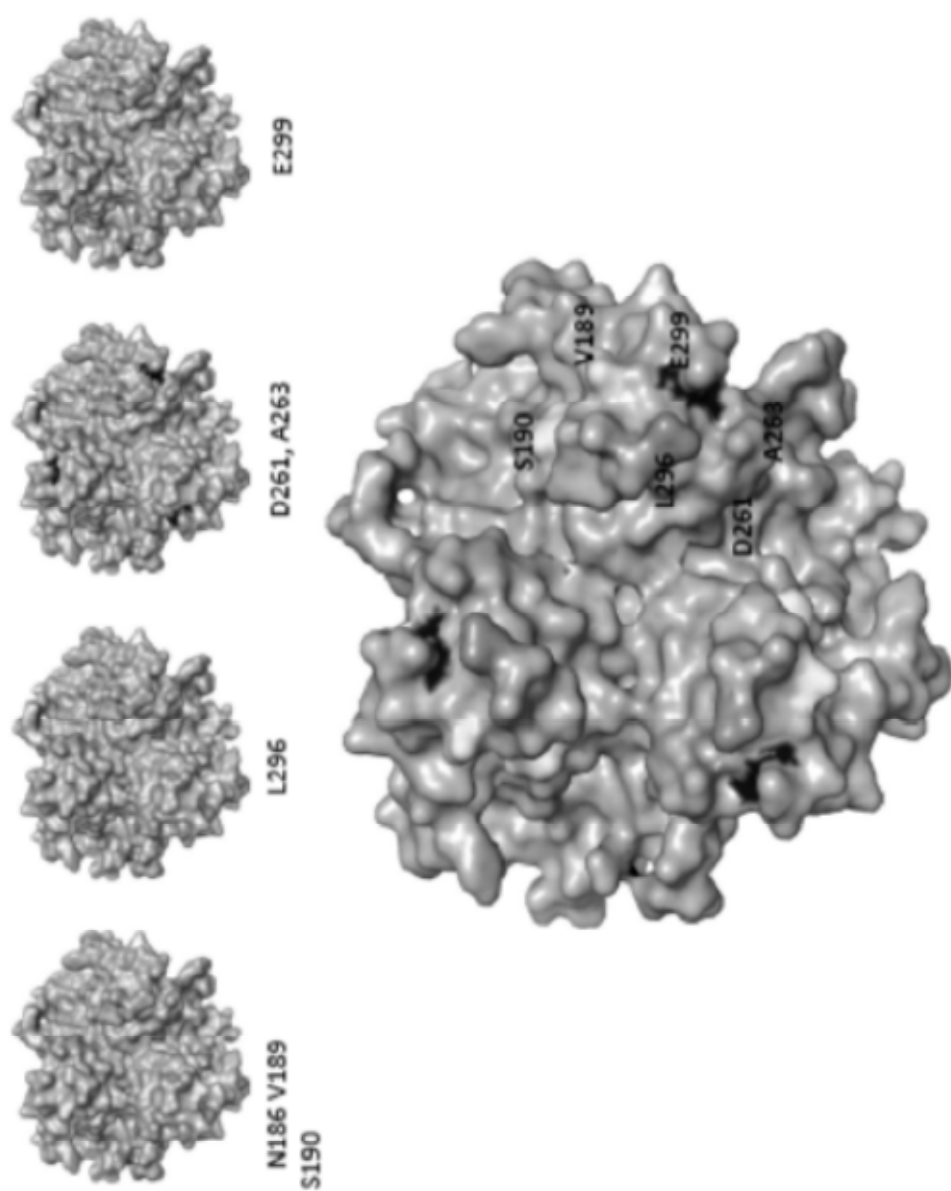


Figura 2

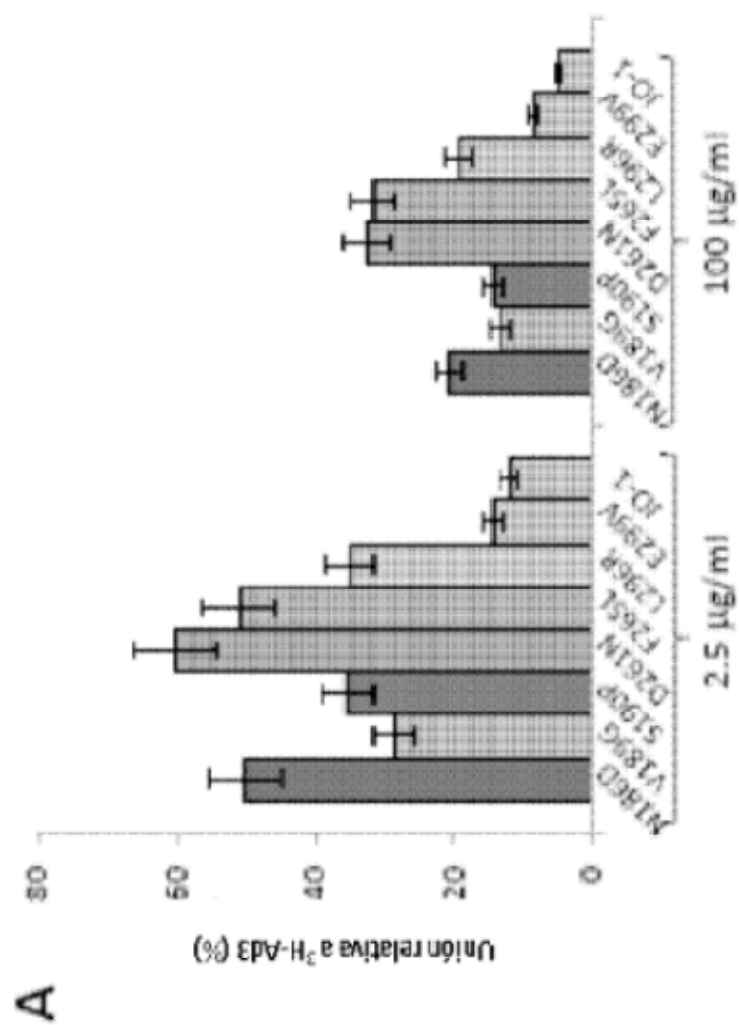


Figura 3a

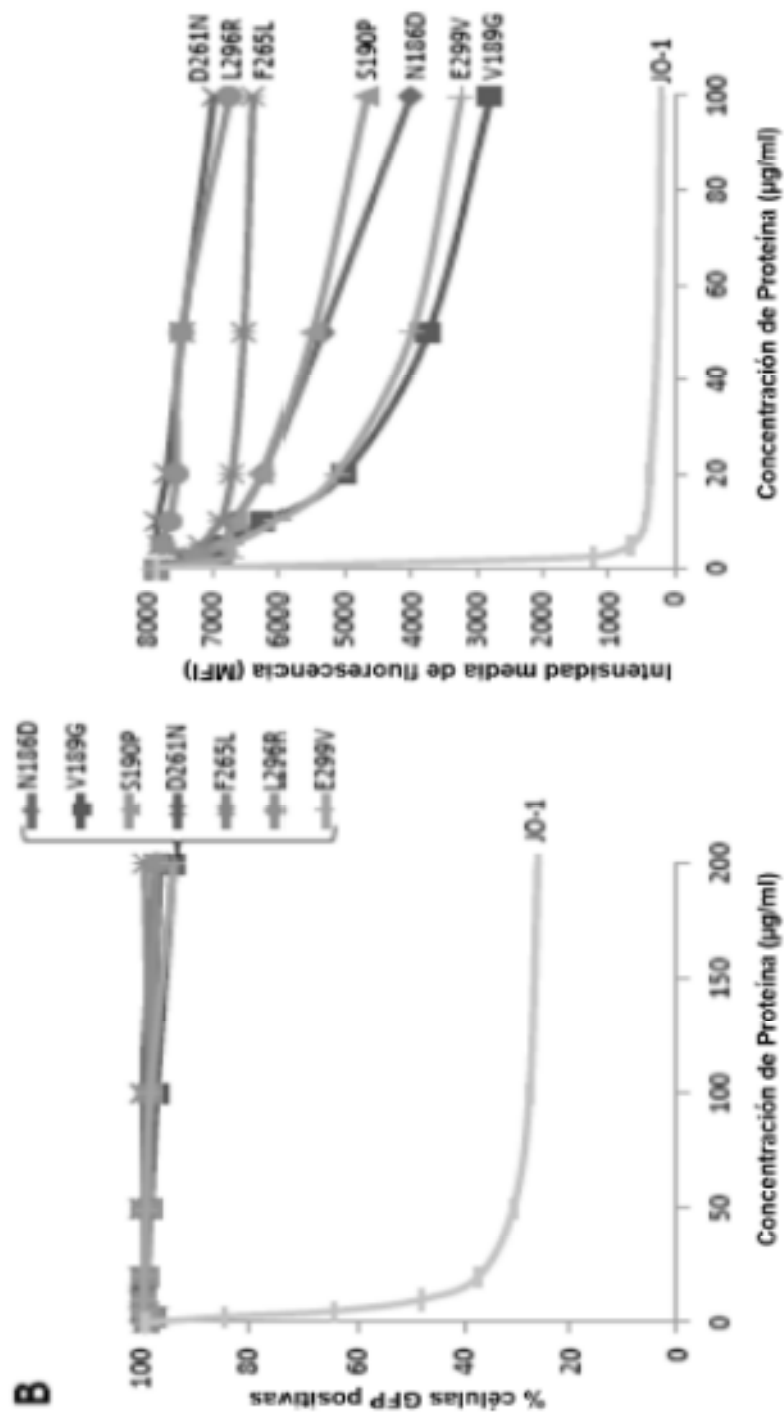
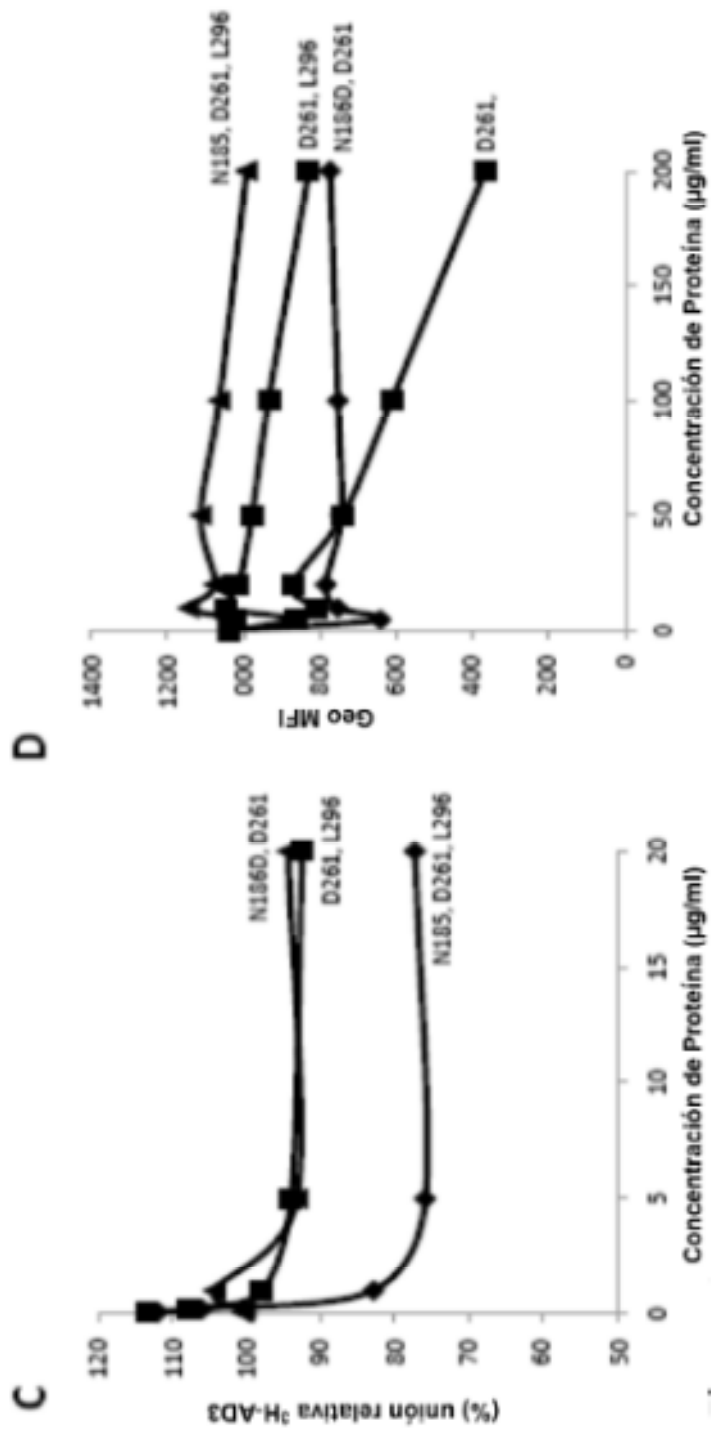


Figura 3b



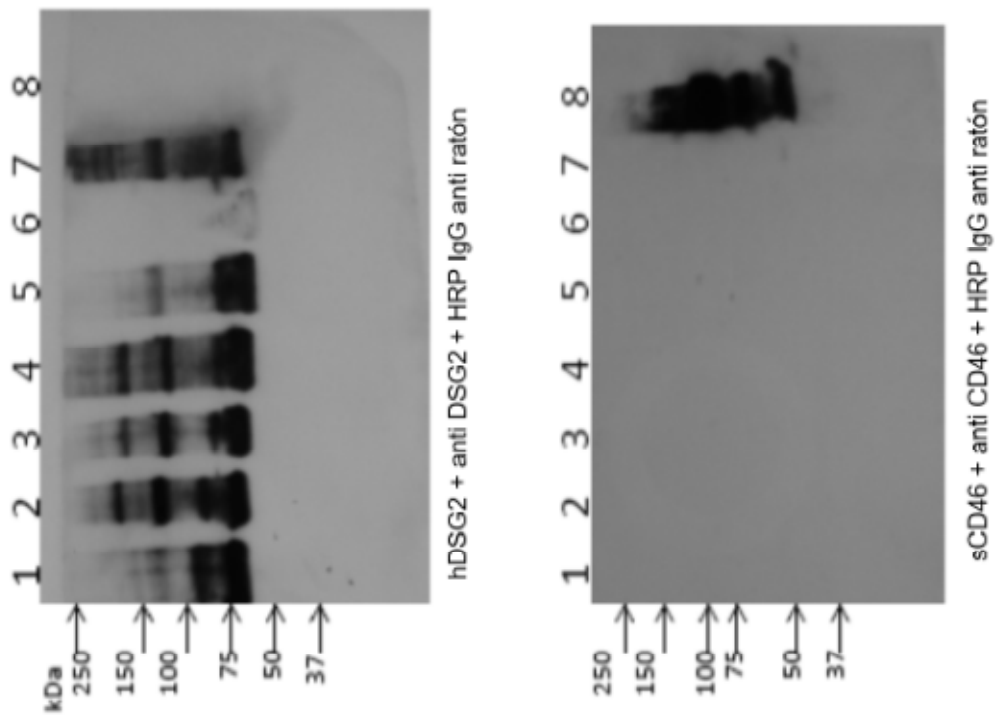


Figura 4

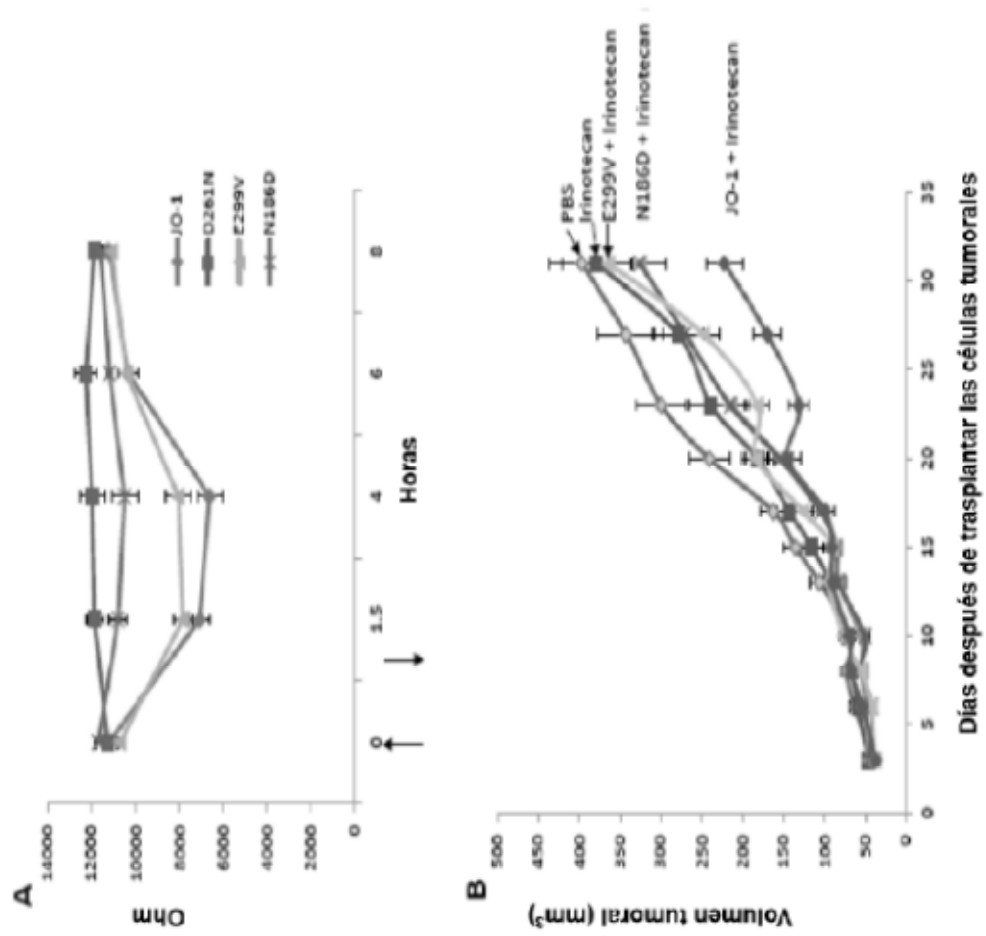


Figura 5

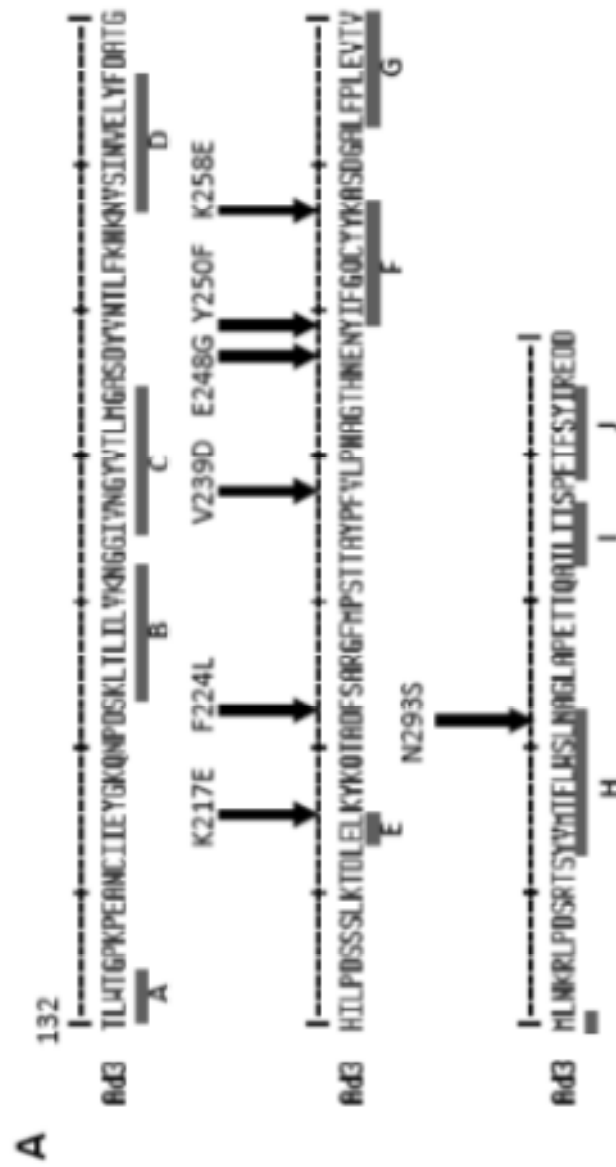


Figura 6a

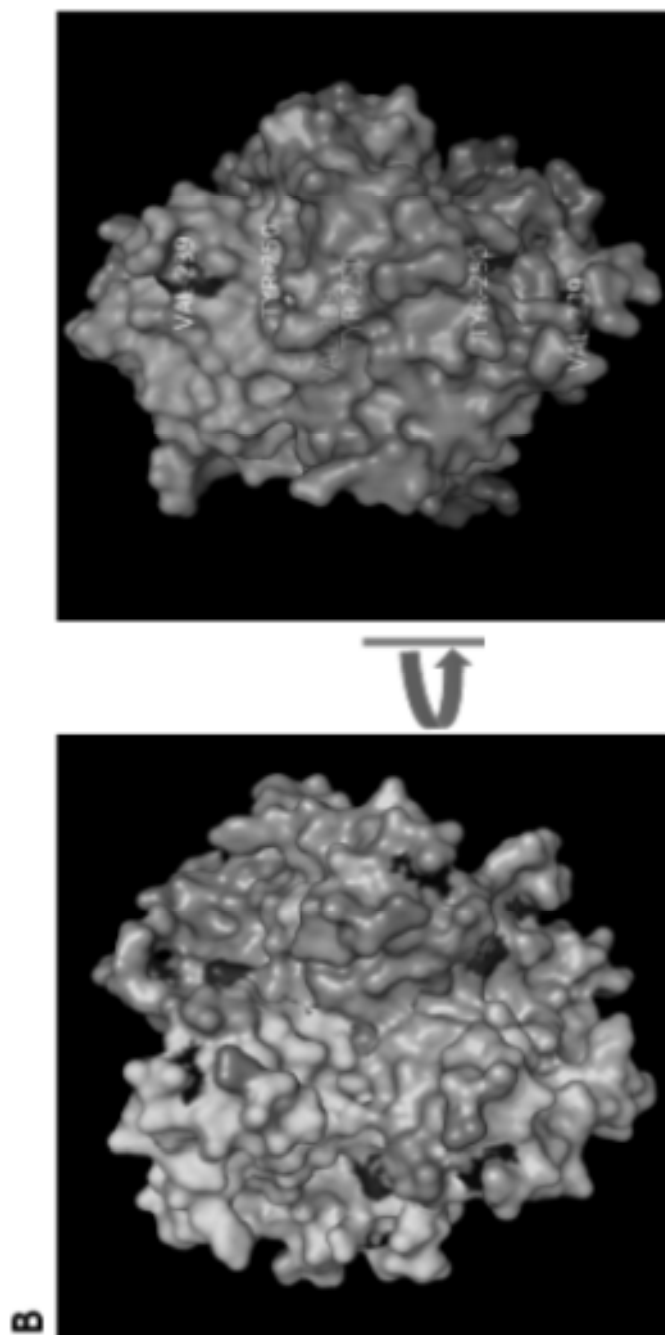


Figure 6b

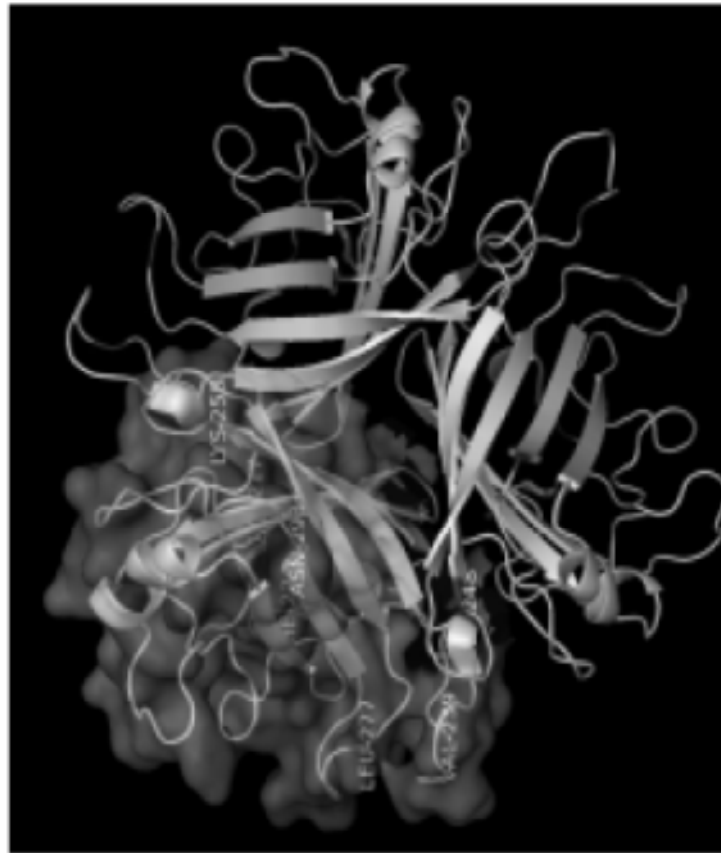


Figura 6c

c

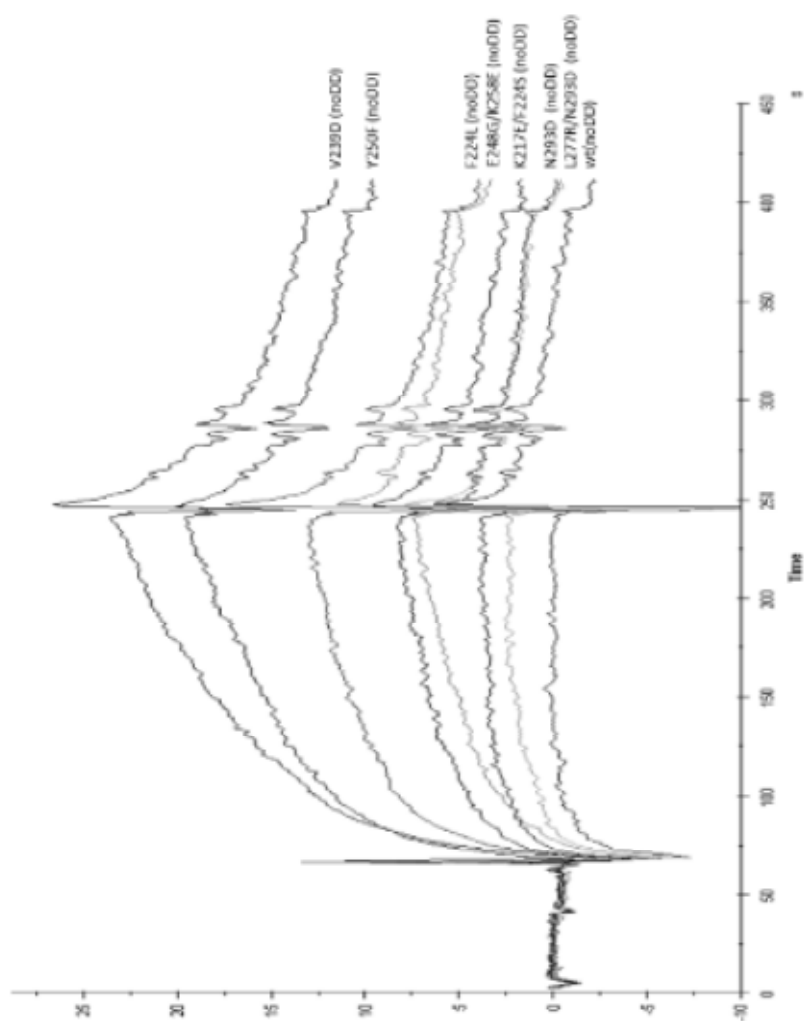


Figure 7a

Mutante	Ka (1/Ms)	Kd(1/s)	K _a (nM)
Y250F (noDD)	2.32E+05	2.64E-03	24.9
K217E, F224S (noDD)	5.88E+04	3.17E-03	53.9
N293S (noDD)	1.19E+03	8.70E-05	73.2
V239D (noDD)	1.07E+05	2.66E-03	11.4
F224L (noDD)	3.42E+04	2.69E-03	78.7
E248G, K258E (noDD)	2.98E+04	1.47E-03	49.4
L277R, N293D (noDD)	1.35E+02	4.30E-03	31800
Wt (noDD)	5.27E+02	5.72E-03	10100

Figura 7b

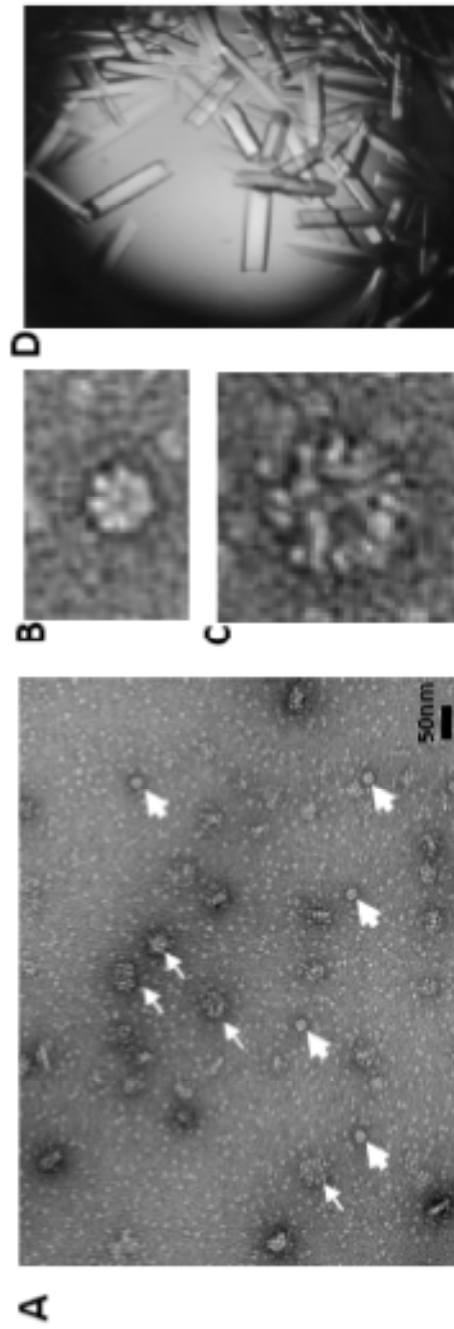


Figura 8a a 8d

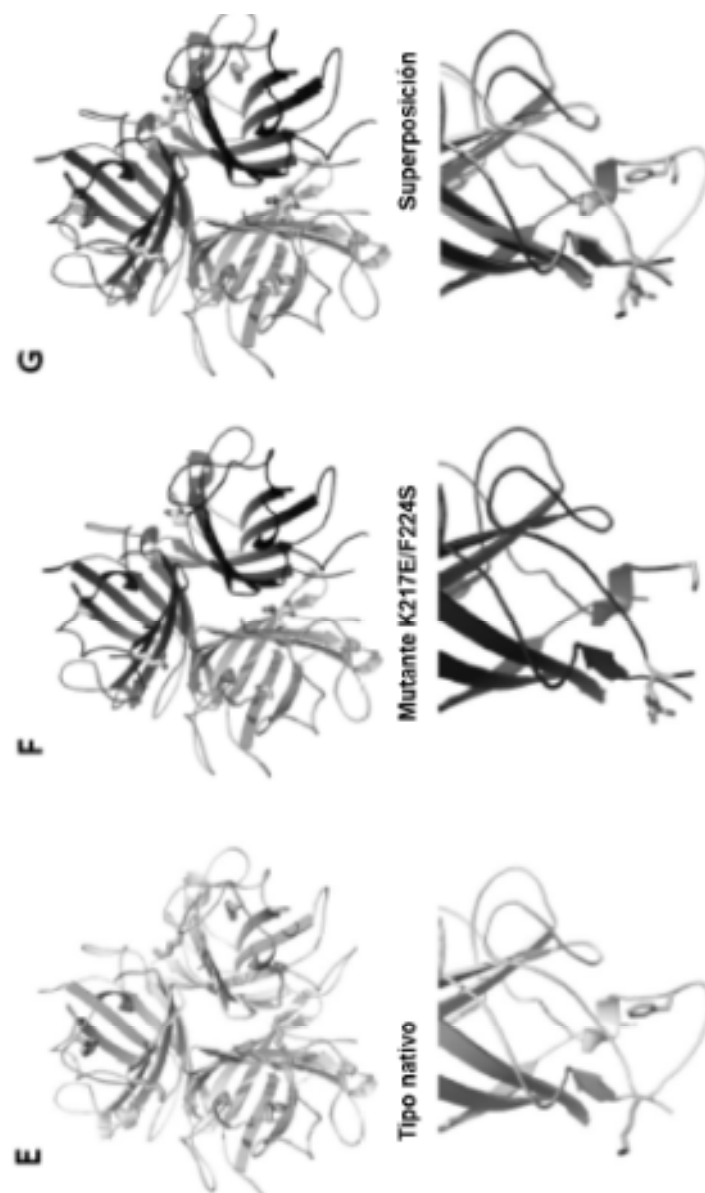


Figura 8e a 8g

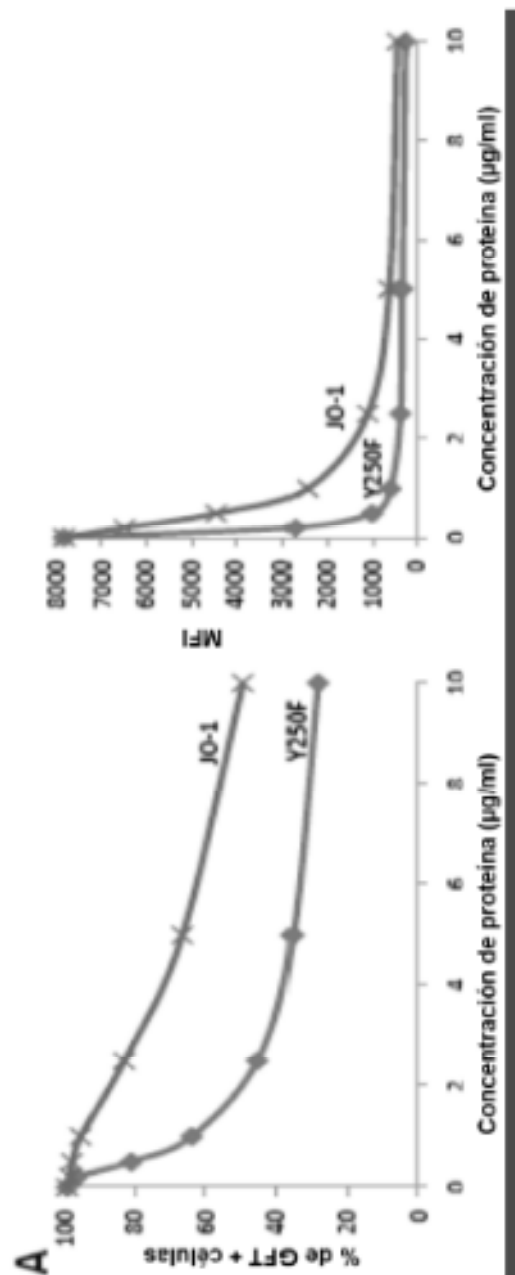


Figura 9a

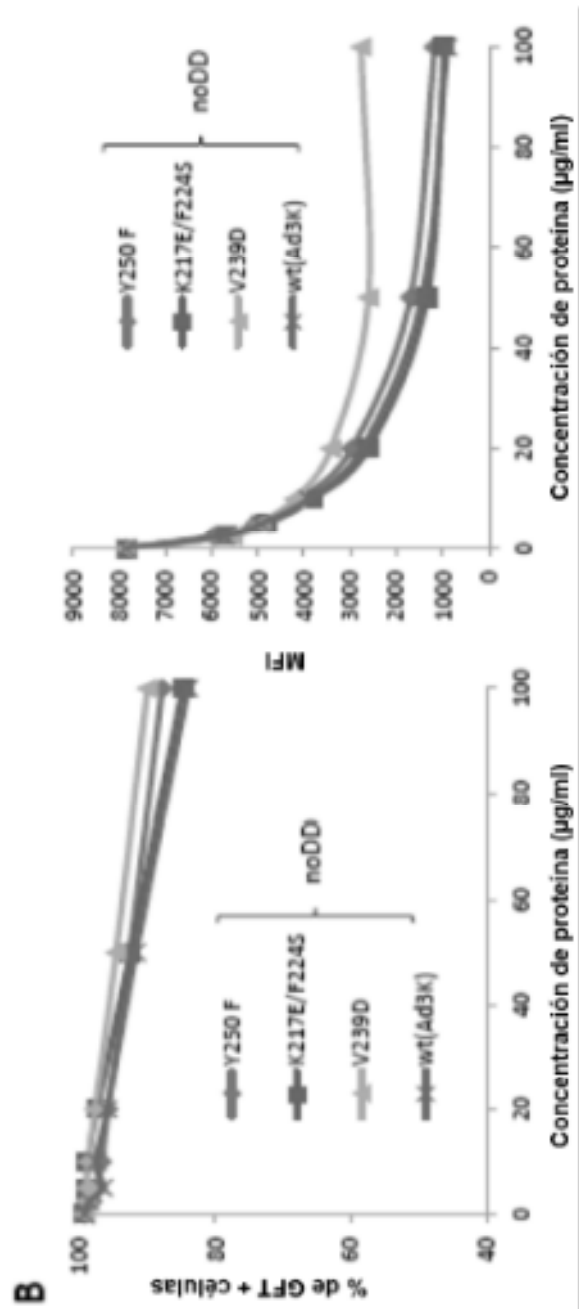


Figura 9b

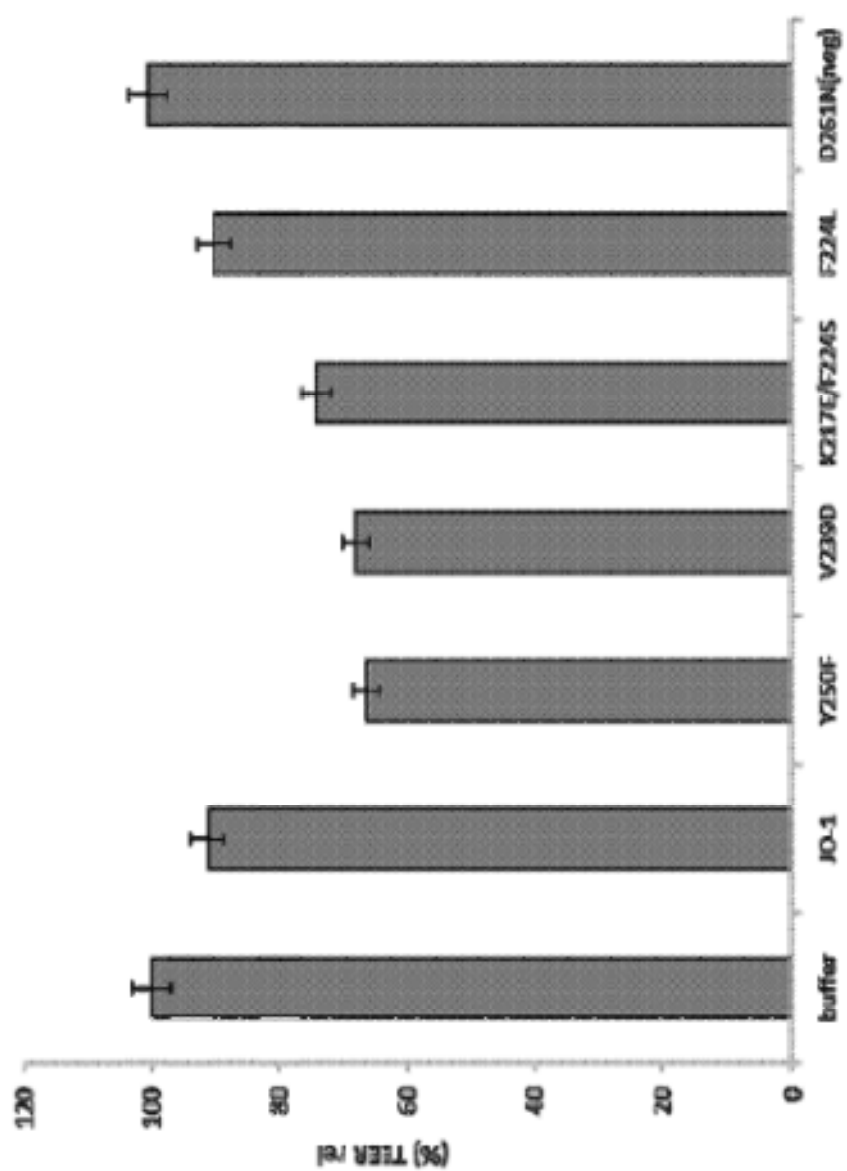


Figura 9c

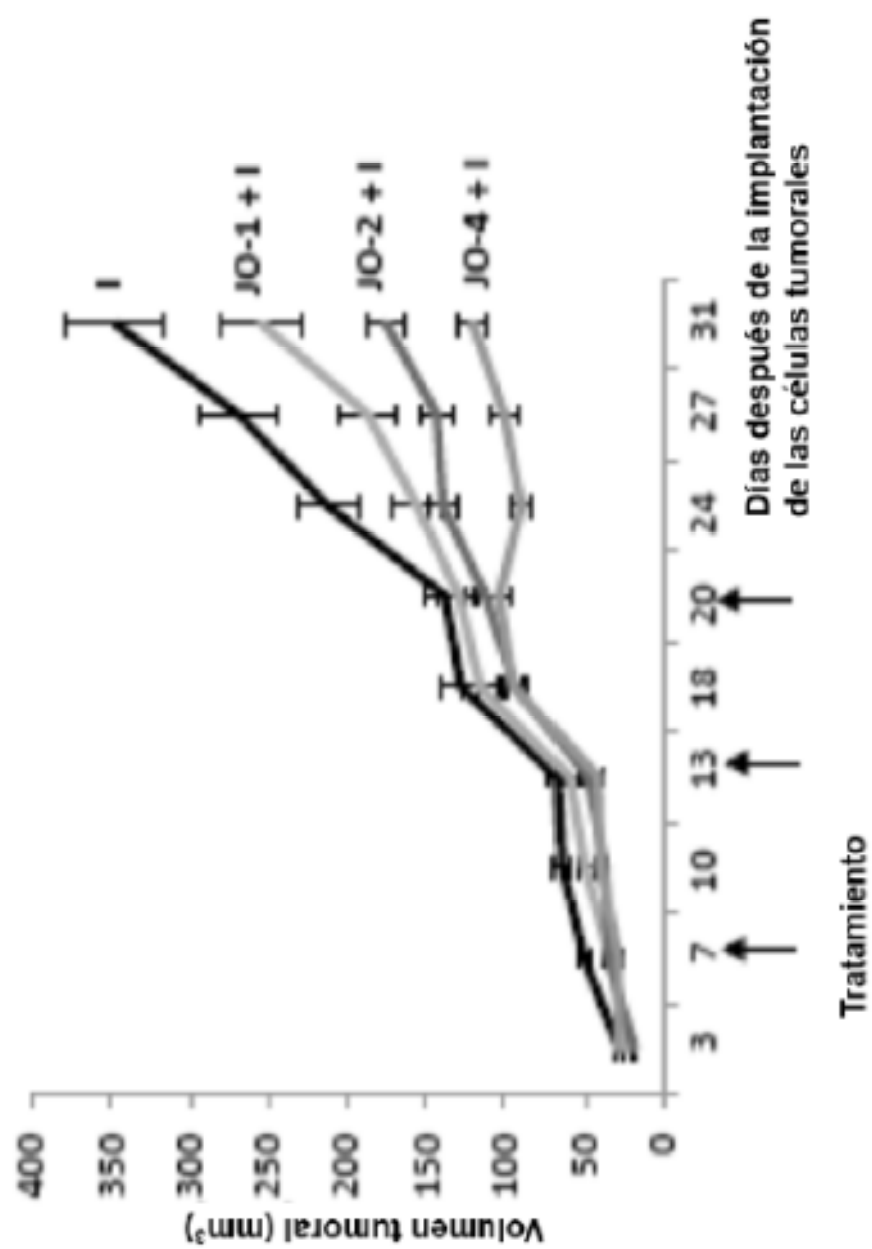


Figura 10a

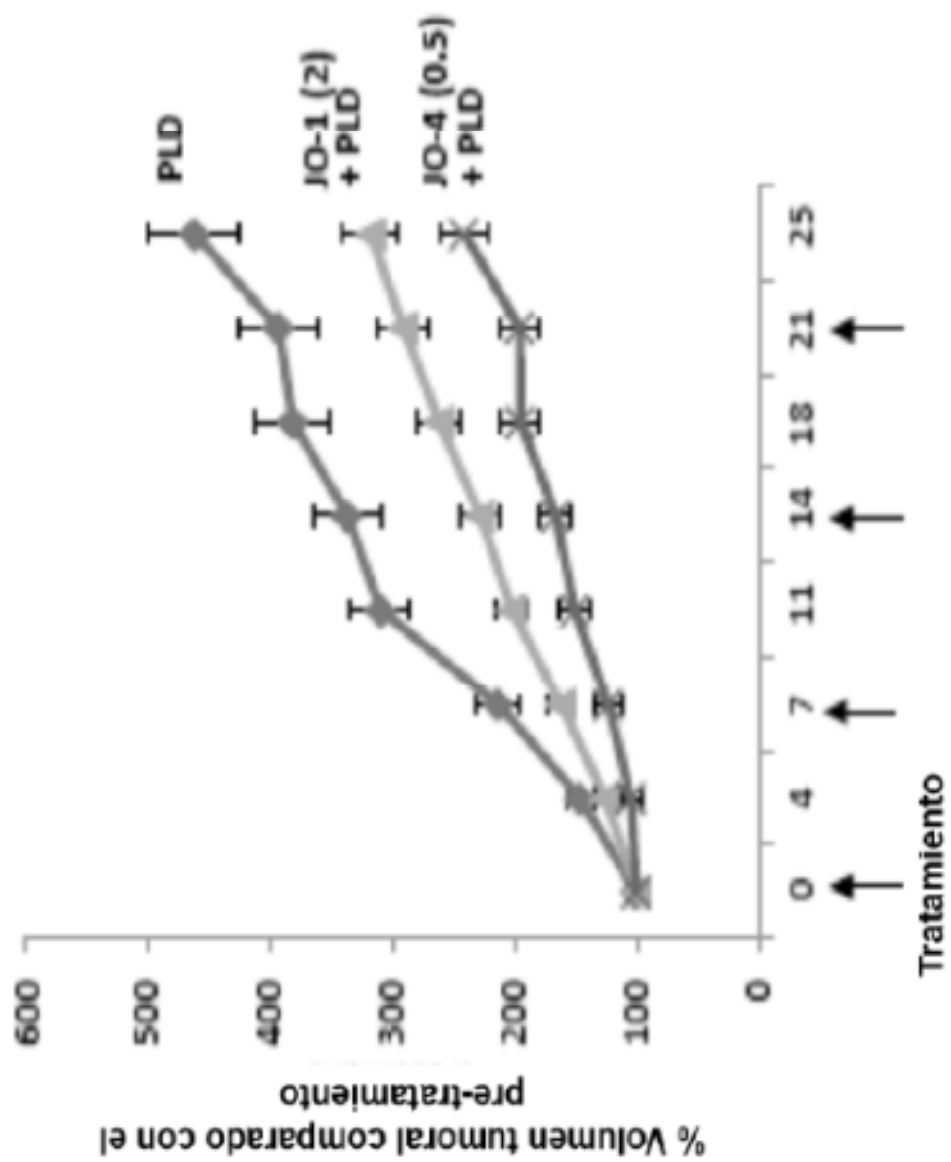


Figura 10b

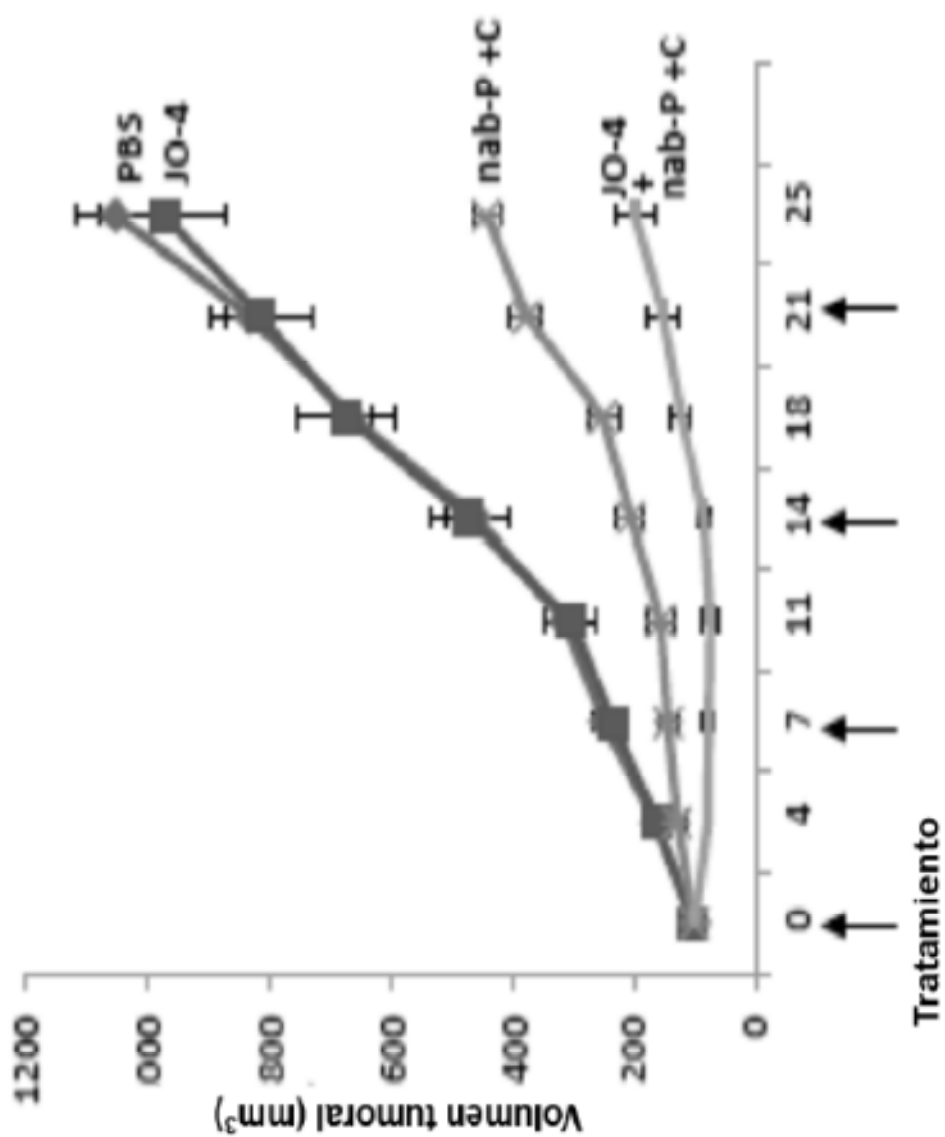


Figura 10c

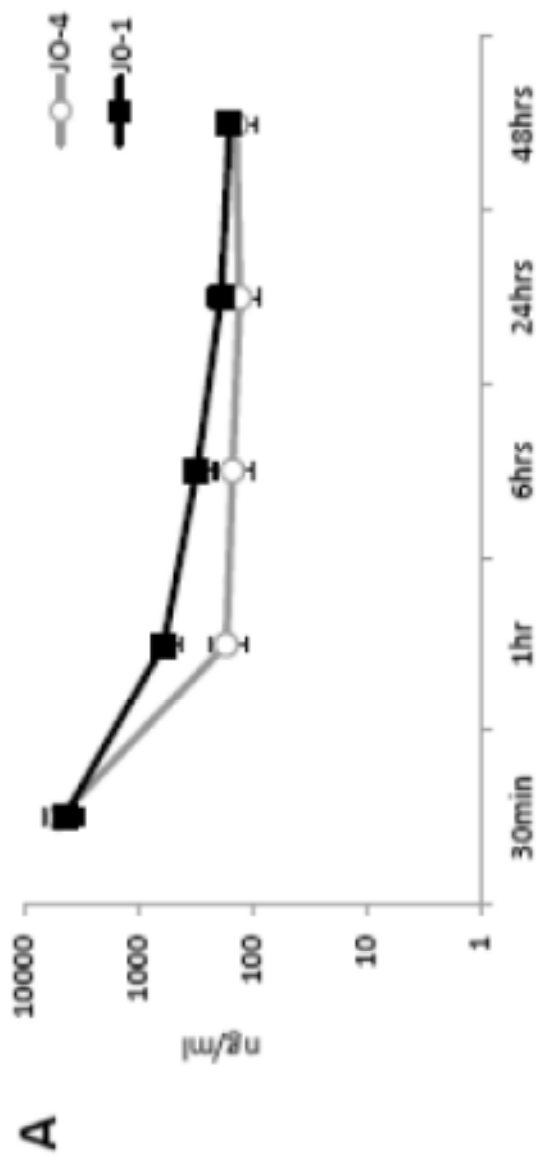


Figura 11a

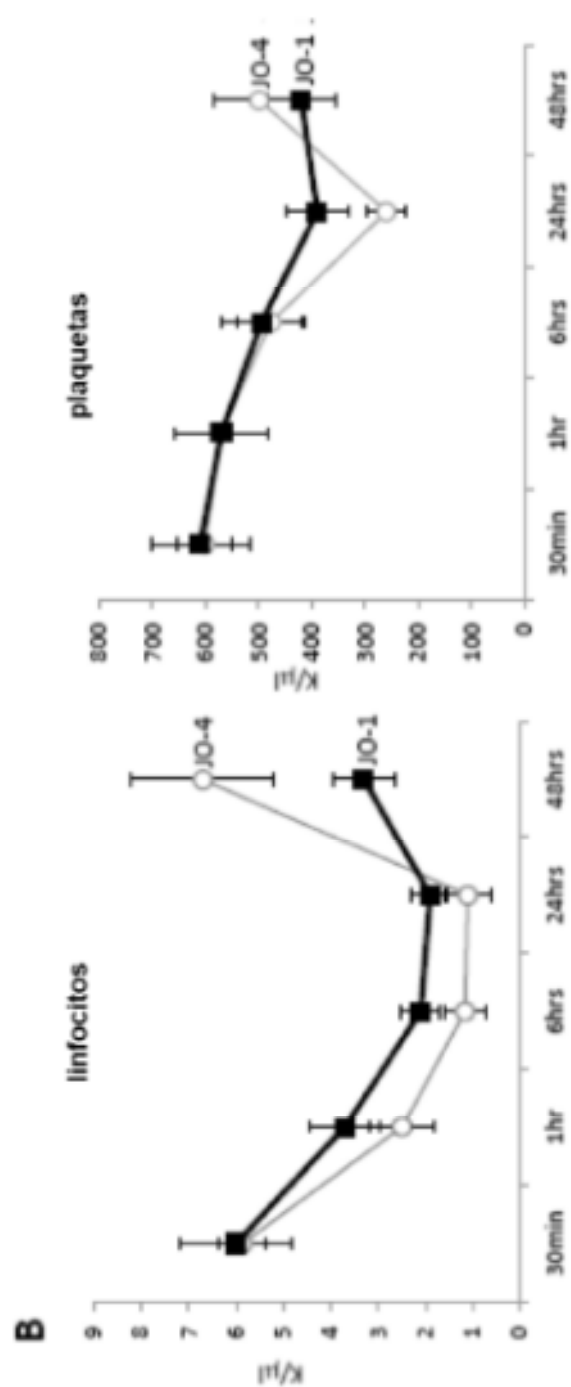


Figura 11b

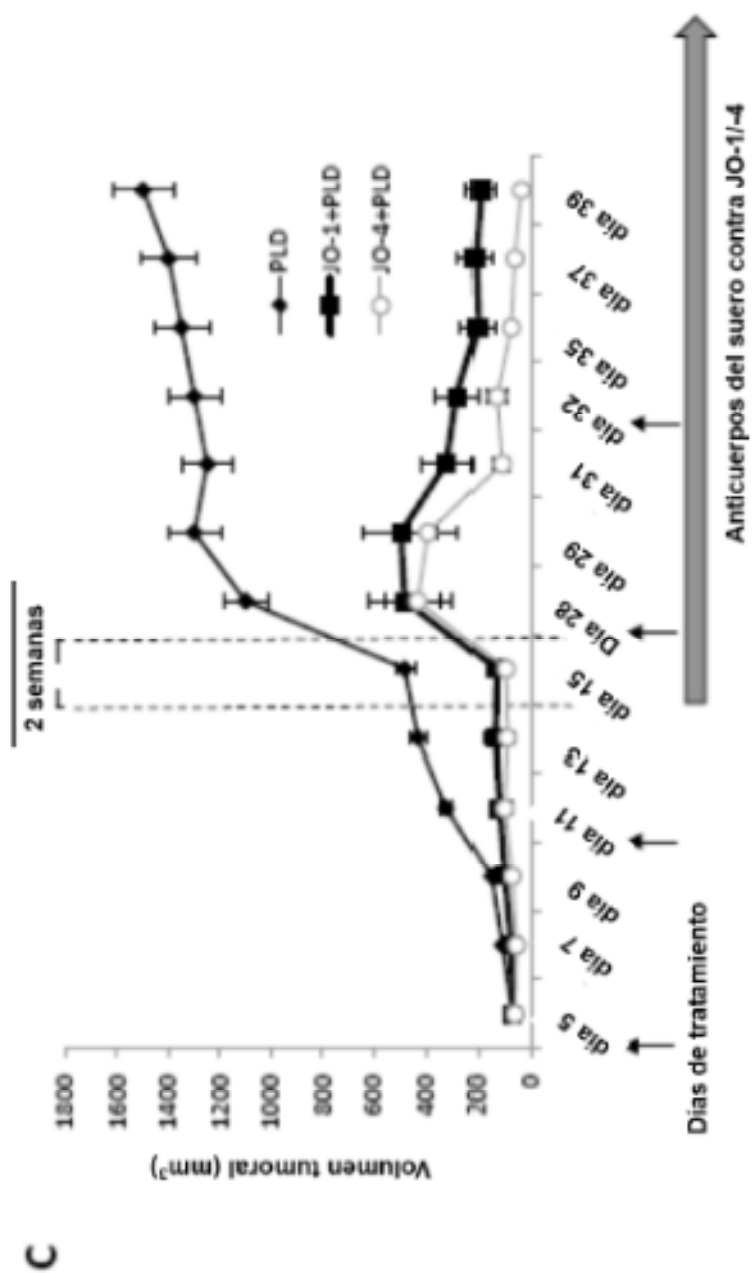


Figura 11c



Figura 12

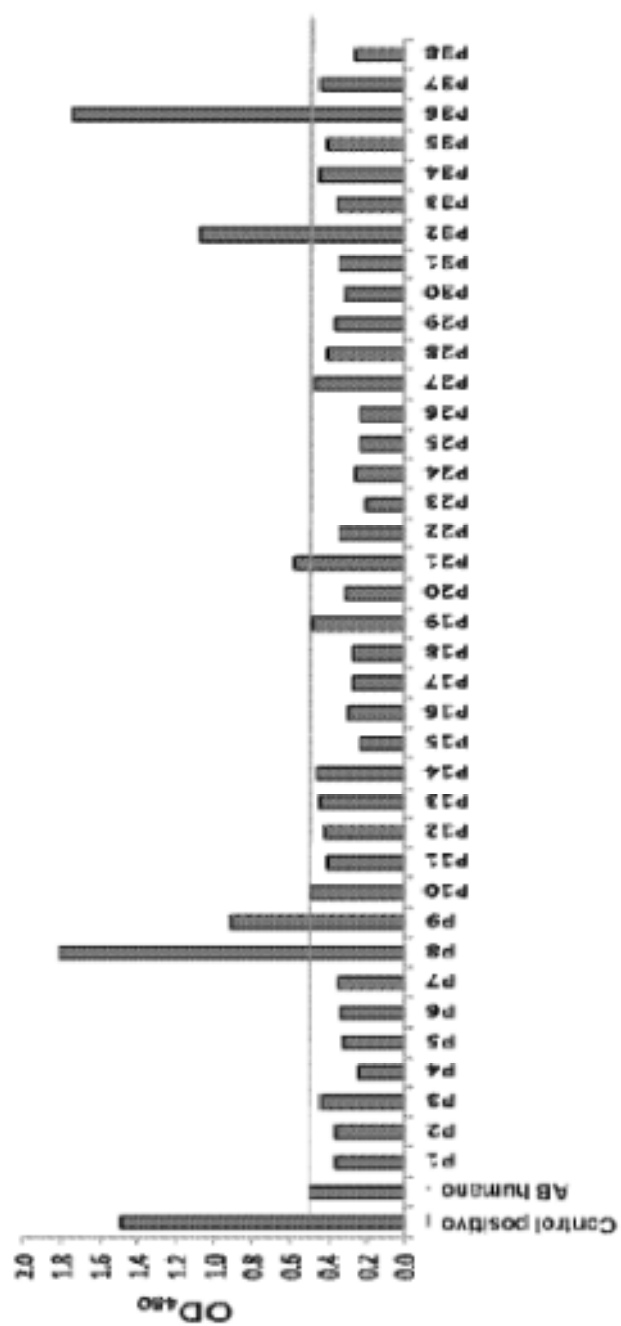


Figura 13