

ANTICUERPOS ANTIPERIOSTINA Y USOS DE ESTOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense con número de serie 62/779.996, presentada el 14 de diciembre de 2018, y la solicitud provisional estadounidense con número de serie 62/899.075, presentada el 11 de septiembre de 2019, las cuales se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES

[0002] La periostina (POSTN) es una proteína matricelular implicada en muchos procesos fisiológicos que incluyen transición epitelial-mesenquimatosa (EMT), interacciones de célula-matriz e inflamación. La POSTN se sobreexpresa en varios contextos patológicos, que incluyen inflamación, enfermedades fibróticas y cáncer donde se correlaciona con un pronóstico desfavorable. En el cáncer, la POSTN es expresada por lo general por células estromales tales como fibroblastos asociados a cáncer (CAF), aunque la expresión de POSTN también se informó en células iniciadoras de cáncer (CIC) y MDSC. La POSTN regula la remodelación extracelular al fijar otras proteínas matricelulares, tales como la fibronectina y el colágeno, y actúa como un ligando del receptor de integrina para promover la supervivencia celular, la migración/invasión, la EMT, la angiogénesis y el reclutamiento de células inmunitarias. Se plantea la hipótesis de que la POSTN impulsa el crecimiento y la progresión tumorales al actuar en múltiples aspectos de la biología del cáncer, que incluye inhibir la inmunidad antitumoral al promover la exclusión inmunitaria y aumentar la inmunodepresión causada por células mieloides que infiltran tumores.

SÍNTESIS

[0003] Se describen en la presente anticuerpos que inhiben las funciones de la periostina, tales como la unión celular mediada por integrina. Dichos anticuerpos son útiles para el tratamiento contra el cáncer. Los anticuerpos antiperiostina descritos en la presente disminuyen el contenido de colágeno de los tumores y reducen la infiltración de las poblaciones de células mieloides supresoras, tales como las células granulocíticas y los macrófagos asociados a tumores, mientras que aumentan la polarización del macrófago a un fenotipo M1 y aumentan la acumulación y las propiedades antitumorales de los linfocitos T que infiltran tumores.

[0004] Se describe en la presente un anticuerpo recombinante o fragmento de fijación

al antígeno de este que se fija a la periostina, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este comprende: una CDR1 de la cadena pesada de inmunoglobulina (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 1 (GYTFTSYG); una CDR2 de la cadena pesada de inmunoglobulina (CDR-H2) que comprende una secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 2 (ISAYNGNT), 3 (ISAYSGNT), 4 (ISAYQGNT), 5 (ISAYTGNT) o 6 (ISAYDGNT); una CDR3 de la cadena pesada de inmunoglobulina (CDR-H3) que comprende una secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 7 (DILVVPFDY), 8 (DVLVVPFDY) o 9 (DMLVVPFDY); una CDR1 de la cadena liviana de inmunoglobulina (CDR-L1) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 10 (SSDIGSNR); una CDR2 de la cadena liviana de inmunoglobulina (CDR-L2) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 11 (SND); y una CDR3 de la cadena liviana de inmunoglobulina (CDR-L3) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 12 (AAWDDSLSTYV). En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este comprende: una CDR1 de la cadena pesada de inmunoglobulina (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 1 (GYTFTSYG); una CDR2 de la cadena pesada de inmunoglobulina (CDR-H2) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 2 (ISAYNGNT); una CDR3 de la cadena pesada de inmunoglobulina (CDR-H3) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 9 (DMLVVPFDY); una CDR1 de la cadena liviana de inmunoglobulina (CDR-L1) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 10 (SSDIGSNR); una CDR2 de la cadena liviana de inmunoglobulina (CDR-L2) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 11 (SND); y una CDR3 de la cadena liviana de inmunoglobulina (CDR-L3) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 12 (AAWDDSLSTYV). En algunas formas de realización, el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este es humano, quimérico o humanizado. En algunas formas de realización, el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este es un anticuerpo IgG. En ciertas formas de realización, el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una o más mutaciones para reducir una o más funciones efectoras del anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este. En ciertas formas de realización, la una o más mutaciones

para reducir una o más funciones efectoras del anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este comprenden una o más mutaciones o conjuntos de mutaciones seleccionadas de: N434A, N434H, T307A/E380A/N434A, M252Y/S254T/T256E, 433K/434F/436H, T250Q, T250F, M428L, M428F, T250Q/M428L, N434S, V308W, V308Y, V308F, M252Y/M428L, D259I/V308F, M428L/V308F, Q311V/N434S, T307Q/N434A, E258F/V427T, S228P, L235E, S228P/L235E/R409K, S228P/L235E, K370Q, K370E, eliminación de G446, eliminación de K447, y combinaciones de estas de IgG4 de acuerdo con el sistema de numeración EU. En ciertas formas de realización, la una o más mutaciones para reducir una o más funciones efectoras del anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este comprenden las mutaciones S228P, F234A y L235A de IgG4 de acuerdo con el sistema de numeración EU. En algunas formas de realización, el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este es un Fab, F(ab)₂, un anticuerpo de dominio único o un fragmento variable monocatenario (scFv). En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de la cadena liviana de inmunoglobulina: en donde la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o que es 100 % idéntica a la que se establece en SEQ ID NO: 13; y en donde la región variable de la cadena liviana de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o que es 100 % idéntica a la que se establece en SEQ ID NO: 14, en donde el aminoácido en el residuo de aminoácido número 55 de SEQ ID NO: 13 es asparagina, serina, glutamina, treonina o ácido aspártico, y en donde el aminoácido en el residuo de aminoácido número 100 de SEQ ID NO: 13 es metionina, isoleucina o valina. En algunas formas de realización, el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este requiere al menos uno de los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15 para la fijación específica a la periostina. En algunas formas de realización, el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este requiere al menos dos, tres, cuatro o cinco de los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15 para la fijación específica a la periostina. En algunas formas de realización, el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este requiere al menos la totalidad de los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15 para la fijación específica a la periostina. También se

describe en la presente una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este y un excipiente, portador o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica está formulada para administración intravenosa. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica está formulada para administración subcutánea. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica está formulada para administración intratumoral. También se describe en la presente el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este o la composición farmacéutica para su uso en la disminución del contenido de colágeno en un tumor. En algunas formas de realización, el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este o la composición farmacéutica es para su uso en el tratamiento contra el cáncer. En algunas formas de realización, el cáncer comprende glioblastoma, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de piel, cáncer de estómago, mesotelioma, cáncer de hígado, cáncer de endometrio, cáncer de colon, cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata o cáncer de pulmón. También se describe en la presente un método para disminuir el contenido de colágeno en un tumor en un individuo que comprende administrar al individuo el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este o la composición farmacéutica. También se describe en la presente un método para aumentar el fenotipo de macrófago M1 y/o reducir el fenotipo de macrófago M2 en un tumor en un individuo que comprende administrar al individuo el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este o la composición farmacéutica. También se describe en la presente un método para reducir la acumulación de células mieloides granulocíticas supresoras y/o macrófagos asociados a tumores en un individuo que comprende administrar al individuo el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este o la composición farmacéutica. También se describe en la presente un método para aumentar la frecuencia de los linfocitos T CD4+ y/o CD8+ en un tumor de un individuo que comprende administrar al individuo el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este o la composición farmacéutica. También se describe en la presente un método para aumentar la función de los linfocitos T CD8+ en un tumor, medida por la expresión y/o liberación de interferón gamma por parte de los linfocitos T CD8+, en un individuo que comprende administrar al individuo el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este o la composición farmacéutica. También se describe en la presente un método

para tratar el cáncer en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este o la composición farmacéutica. En algunas formas de realización, el cáncer comprende glioblastoma, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de piel, cáncer de estómago, mesotelioma, cáncer de hígado, cáncer de endometrio, cáncer de colon, cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata o cáncer de pulmón. También se describe en la presente un método para elaborar una composición para disminuir el contenido de colágeno en un tumor que comprende mezclar el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este y un excipiente, portador o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. También se describe en la presente un método para elaborar una composición para aumentar el fenotipo de macrófago M1 y/o reducir el fenotipo de macrófago M2 en un tumor que comprende mezclar el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este y un excipiente, portador o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. También se describe en la presente un método para elaborar una composición para reducir la acumulación de células mieloides granulocíticas supresoras y/o macrófagos asociados a tumores en un individuo que comprende mezclar el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este y un excipiente, portador o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. También se describe en la presente un método para elaborar una composición para aumentar la frecuencia de los linfocitos T CD4+ y/o CD8+ en un tumor de un individuo que comprende mezclar el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este y un excipiente, portador o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. También se describe en la presente un método para elaborar una composición para aumentar la función de los linfocitos T CD8+ en un tumor, medida por la expresión y/o liberación de interferón gamma por parte de los linfocitos T CD8+, en un individuo que comprende mezclar el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este y un excipiente, portador o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. También se describe en la presente un método para elaborar una composición para tratar el cáncer que comprende mezclar el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este y un excipiente, portador o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. En algunas formas de realización, el cáncer comprende glioblastoma, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de piel, cáncer de estómago,

mesotelioma, cáncer de hígado, cáncer de endometrio, cáncer de colon, cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata o cáncer de pulmón.

[0005] También se describe en la presente un anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a la periostina, que comprende una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de la cadena liviana de inmunoglobulina: en donde la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o que es 100 % idéntica a la que se establece en SEQ ID NO: 13; y en donde la región variable de la cadena liviana de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o que es 100 % idéntica a la que se establece en SEQ ID NO: 14, en donde el residuo de aminoácido número 55 de SEQ ID NO: 13 es asparagina, serina, glutamina, treonina o ácido aspártico, y en donde el residuo de aminoácido número 100 de SEQ ID NO: 13 es metionina, isoleucina o valina. En algunas formas de realización, el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este es un anticuerpo humano. En algunas formas de realización, el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este es un anticuerpo IgG. En ciertas formas de realización, el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una o más mutaciones para reducir una o más funciones efectoras del anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este. En ciertas formas de realización, la una o más mutaciones para reducir una o más funciones efectoras del anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este comprenden una o más mutaciones o conjuntos de mutaciones seleccionadas de: N434A, N434H, T307A/E380A/N434A, M252Y/S254T/T256E, 433K/434F/436H, T250Q, T250F, M428L, M428F, T250Q/M428L, N434S, V308W, V308Y, V308F, M252Y/M428L, D259I/V308F, M428L/V308F, Q311V/N434S, T307Q/N434A, E258F/V427T, S228P, L235E, S228P/L235E/R409K, S228P/L235E, K370Q, K370E, eliminación de G446, eliminación de K447, y combinaciones de estas de IgG4 de acuerdo con el sistema de numeración EU. En ciertas formas de realización, la una o más mutaciones para reducir una o más funciones efectoras del anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este comprenden las mutaciones S228P, F234A y L235A de IgG4 de acuerdo con el sistema de numeración EU. En algunas formas de realización, el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este es un Fab, F(ab)2, un anticuerpo de dominio único o un fragmento variable monocatenario (scFv). También se describe en la presente una

composición farmacéutica que comprende el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este y un excipiente, portador o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica está formulada para administración intravenosa. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica está formulada para administración subcutánea. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica está formulada para administración intratumoral. También se describe en la presente el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este o la composición farmacéutica para su uso en la disminución del contenido de colágeno en un tumor. En algunas formas de realización, el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este o la composición farmacéutica es para su uso en el tratamiento contra el cáncer. En algunas formas de realización, el cáncer comprende glioblastoma, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de piel, cáncer de estómago, mesotelioma, cáncer de hígado, cáncer de endometrio, cáncer de colon, cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata o cáncer de pulmón. También se describe en la presente un método para disminuir el contenido de colágeno en un tumor en un individuo que comprende administrar al individuo el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este o la composición farmacéutica. También se describe en la presente un método para aumentar el fenotipo de macrófago M1 y/o reducir el fenotipo de macrófago M2 en un tumor en un individuo que comprende administrar al individuo el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este o la composición farmacéutica. También se describe en la presente un método para reducir la acumulación de células mieloides granulocíticas supresoras y/o macrófagos asociados a tumores en un individuo que comprende administrar al individuo el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este o la composición farmacéutica. También se describe en la presente un método para aumentar la frecuencia de los linfocitos T CD4+ y/o CD8+ en un tumor de un individuo que comprende administrar al individuo el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este o la composición farmacéutica. También se describe en la presente un método para aumentar la función de los linfocitos T CD8+ en un tumor, medida por la expresión y/o liberación de interferón gamma por parte de los linfocitos T CD8+, en un individuo que comprende administrar al individuo el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este o la composición farmacéutica. También se describe en la presente un método para tratar el cáncer en

un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este o la composición farmacéutica. En algunas formas de realización, el cáncer comprende glioblastoma, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de piel, cáncer de estómago, mesotelioma, cáncer de hígado, cáncer de endometrio, cáncer de colon, cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata o cáncer de pulmón. También se describe en la presente un método para elaborar una composición para disminuir el contenido de colágeno en un tumor que comprende mezclar el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este y un excipiente, portador o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. También se describe en la presente un método para elaborar una composición para aumentar el fenotipo de macrófago M1 y/o reducir el fenotipo de macrófago M2 en un tumor que comprende mezclar el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este y un excipiente, portador o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. También se describe en la presente un método para elaborar una composición para reducir la acumulación de células mieloides granulocíticas supresoras y/o macrófagos asociados a tumores en un individuo que comprende mezclar el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este y un excipiente, portador o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. También se describe en la presente un método para elaborar una composición para aumentar la frecuencia de los linfocitos T CD4+ y/o CD8+ en un tumor en un individuo que comprende mezclar el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este y un excipiente, portador o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. También se describe en la presente un método para elaborar una composición para aumentar la función de los linfocitos T CD8+ en un tumor, medida por la expresión y/o liberación de interferón gamma por parte de los linfocitos T CD8+, en un individuo que comprende mezclar el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este y un excipiente, portador o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. También se describe en la presente un método para elaborar una composición para tratar el cáncer que comprende mezclar el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este y un excipiente, portador o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. En algunas formas de realización, el cáncer comprende glioblastoma, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de piel, cáncer de estómago, mesotelioma,

cáncer de hígado, cáncer de endometrio, cáncer de colon, cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata o cáncer de pulmón.

[0006] También se describe en la presente un anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a la periostina, en donde, cuando se fija a la periostina, el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este se fija al dominio de fasciclina 2 (FAS2) de la periostina. En algunas formas de realización, el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este se fija a cualquier residuo entre los residuos de aminoácidos 276 a 302, inclusive, de periostina (SEQ ID NO: 15). En algunas formas de realización, cuando se fija a la periostina, el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este se fija a al menos uno de los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de periostina (SEQ ID NO: 15). En algunas formas de realización, cuando se fija a la periostina, el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este se fija a al menos dos, tres, cuatro o cinco de los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de periostina (SEQ ID NO: 15). En algunas formas de realización, cuando se fija a la periostina, el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este se fija a la totalidad de los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de periostina (SEQ ID NO: 15). En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de la cadena liviana de inmunoglobulina: en donde la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o que es 100 % idéntica a la que se establece en SEQ ID NO: 13; y en donde la región variable de la cadena liviana de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o que es 100 % idéntica a la que se establece en SEQ ID NO: 14, en donde el residuo de aminoácido número 55 de SEQ ID NO: 13 es asparagina, serina, glutamina, treonina o ácido aspártico, y en donde el residuo de aminoácido número 100 de SEQ ID NO: 13 es metionina, isoleucina o valina. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este comprende: una CDR1 de la cadena pesada de inmunoglobulina (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 1 (GYTFTSYG); una CDR2 de la cadena pesada de inmunoglobulina (CDR-H2) que comprende una secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 2 (ISAYNGNT), 3 (ISAYSGNT), 4 (ISAYQGNT), 5 (ISAYTGNT) o 6 (ISAYDGNT); una CDR3 de la

cadena pesada de inmunoglobulina (CDR-H3) que comprende una secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 7 (DILVVPFDY), 8 (DVLVVPFDY) o 9 (DMLVVPFDY); una CDR1 de la cadena liviana de inmunoglobulina (CDR-L1) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 10 (SSDIGSNR); una CDR2 de la cadena liviana de inmunoglobulina (CDR-L2) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 11 (SND); y una CDR3 de la cadena liviana de inmunoglobulina (CDR-L3) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 12 (AAWDDSLSTYV). En algunas formas de realización, el anticuerpo tiene una IC50 menor de alrededor de 50 nanomolar en un ensayo de adhesión celular realizado con células de fibroblastos de pulmón humano y/o células de fibroblastos de ratón. También se describe en la presente una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este y un excipiente, portador o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica está formulada para administración intravenosa. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica está formulada para administración subcutánea. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica está formulada para administración intratumoral. También se describe en la presente el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este o la composición farmacéutica para su uso en la disminución del contenido de colágeno en un tumor. En algunas formas de realización, el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este o la composición farmacéutica es para su uso en el tratamiento contra el cáncer. En algunas formas de realización, el cáncer comprende glioblastoma, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de piel, cáncer de estómago, mesotelioma, cáncer de hígado, cáncer de endometrio, cáncer de colon, cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata o cáncer de pulmón. También se describe en la presente un método para disminuir el contenido de colágeno en un tumor en un individuo que comprende administrar al individuo el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este o la composición farmacéutica. También se describe en la presente un método para aumentar el fenotipo de macrófago M1 y/o reducir el fenotipo de macrófago M2 en un tumor en un individuo que comprende administrar al individuo el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este o la composición farmacéutica. También se describe en la presente un método para reducir la acumulación de células mieloides granulocíticas supresoras y/o macrófagos

asociados a tumores en un individuo que comprende administrar al individuo el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este o la composición farmacéutica. También se describe en la presente un método para aumentar la frecuencia de los linfocitos T CD4+ y/o CD8+ en un tumor en un individuo que comprende administrar al individuo el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este o la composición farmacéutica. También se describe en la presente un método para aumentar la función de los linfocitos T CD8+ en un tumor, medida por la expresión y/o liberación de interferón gamma por parte de los linfocitos T CD8+, en un individuo que comprende administrar al individuo el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este o la composición farmacéutica. También se describe en la presente un método para tratar el cáncer en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este o la composición farmacéutica. En algunas formas de realización, el cáncer comprende glioblastoma, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de piel, cáncer de estómago, mesotelioma, cáncer de hígado, cáncer de endometrio, cáncer de colon, cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata o cáncer de pulmón. También se describe en la presente un método para elaborar una composición para disminuir el contenido de colágeno en un tumor que comprende mezclar el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este y un excipiente, portador o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. También se describe en la presente un método para elaborar una composición para aumentar el fenotipo de macrófago M1 y/o reducir el fenotipo de macrófago M2 en un tumor que comprende mezclar el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este y un excipiente, portador o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. También se describe en la presente un método para elaborar una composición para reducir la acumulación de células mieloides granulocíticas supresoras y/o macrófagos asociados a tumores en un individuo que comprende mezclar el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este y un excipiente, portador o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. También se describe en la presente un método para elaborar una composición para aumentar la frecuencia de los linfocitos T CD4+ y/o CD8+ en un tumor de un individuo que comprende mezclar el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este y un excipiente, portador o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. También se describe en la presente

un método para elaborar una composición para aumentar la función de los linfocitos T CD8+ en un tumor, medida por la expresión y/o liberación de interferón gamma por parte de los linfocitos T CD8+, en un individuo que comprende mezclar el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este y un excipiente, portador o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. También se describe en la presente un método para elaborar una composición para tratar el cáncer que comprende mezclar el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este y un excipiente, portador o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. En algunas formas de realización, el cáncer comprende glioblastoma, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de piel, cáncer de estómago, mesotelioma, cáncer de hígado, cáncer de endometrio, cáncer de colon, cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata o cáncer de pulmón.

[0007] También se describe en la presente un ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos recombinantes o fragmentos de fijación al antígeno de estos descritos anteriormente.

[0008] También se describe en la presente una línea celular que comprende el ácido nucleico descrito anteriormente. En algunas formas de realización, la línea celular es una línea celular de ovario de hámster chino (CHO). También se describe en la presente un método para producir el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende incubar la línea celular en un medio de cultivo celular en condiciones suficientes para permitir la expresión y secreción de cualquiera de los anticuerpos recombinantes o fragmentos de fijación al antígeno de estos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0009] Las características novedosas descritas en la presente se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se entenderán mejor las características y ventajas descritas en la presente al referirse a la siguiente descripción detallada que establece ejemplos ilustrativos, en los que se utilizan los principios de las características descritas en la presente, y los dibujos adjuntos de los cuales:

[0010] La **Figura 1** ilustra la inhibición de la unión celular mediada por periostina (POSTN) por parte de 78 IgG de secuencia única evaluadas en una concentración única de 500 nM.

[0011] La **Figura 2** ilustra el crecimiento tumoral en el modelo de cáncer de vejiga MB49 de ratón tras el tratamiento con NB0828 o control de vehículo.

[0012] La **Figura 3** ilustra el impacto del tratamiento con NB0828 sobre la

acumulación de células mieloides intratumorales. Los ratones con tumor MB49 se trataron con NB0828 o vehículo como se describe en la **Figura 2**. Los datos se presentan como un porcentaje del infiltrado inmunitario CD45+ total.

[0013] La **Figura 4** ilustra los cambios en el contenido total de colágeno del tumor tras el tratamiento con NB0828. Los ratones con tumor MB49 se trataron como se describe en la **Figura 2**, y se evaluó el contenido total de colágeno de los tumores MB49 finales como se describe en los métodos.

[0014] La **Figura 5** ilustra el crecimiento tumoral en el modelo de cáncer de colon CT26 de ratón tras el tratamiento con NB0828 o control de vehículo.

[0015] La **Figura 6** ilustra una menor acumulación intratumoral de células granulocíticas/TAM (macrófagos asociados a tumores) y un sesgo de los macrófagos hacia un fenotipo M1 en ratones con tumor CT26 tratado con NB0828.

[0016] La **Figura 7** ilustra una mayor acumulación de linfocitos que infiltran tumores (TIL) CD8+ y CD4+ y una mejor función de TIL CD8+ en ratones con tumor CT26 tratado con NB0828.

[0017] La **Figura 8** ilustra el crecimiento tumoral en el modelo de cáncer de colon MC38 de ratón tras el tratamiento con NB0828 o control de vehículo.

[0018] Las **Figuras 9A-9D** ilustran que, en el modelo de cáncer de colon MC38, NB0828 disminuye la cantidad general de macrófagos asociados a tumores (**9A**), mientras que aumenta la frecuencia de macrófagos de tipo I proinflamatorios (**9B**) y los linfocitos T CD8+ (**9C**), y que la eficacia tumoral de NB0828 depende de los linfocitos T CD8+ (**9D**).

[0019] La **Figura 10** ilustra un esquema para generar quimeras de proteína inducida por el factor de crecimiento transformante beta (BIGH3)/periostina para estudios de mapeo de epítomos.

[0020] Las **Figuras 11A-11C** ilustran la fijación de NB0828 al dominio de FAS2 de la periostina. La **Figura 11A** ilustra la fijación de NB0828 a las proteínas quiméricas generadas en la **Figura 10**, mientras que las **Figuras 11B** y **11C** ilustran la fijación de NB0828 a las mutaciones de alanina en el dominio de FAS2 de POSTN EMI-FAS4.

[0021] La **Figura 12** ilustra la estructura cristalina de la POSTN EMI-FAS4 dimérica, en donde la ubicación del epítipo NB0828 está marcada con un recuadro y aumentada en la mitad inferior.

[0022] Las **Figuras 13A** y **13B** ilustran la fijación de EC80 de tenascina C humana a la periostina y la actividad de bloqueo de la función de NB0828 (**13A**), y la fijación de EC80 del colágeno de tipo I humano a la periostina y la actividad de bloqueo de la

función de NB0828 (**13B**).

[0023] La **Figura 14A** describe la prevalencia de la expresión de periostina en diversos tipos de tumor como se mide mediante inmunohistoquímica.

[0024] La **Figura 14B** muestra ilustraciones representativas de tinción de IHC en muestras de cáncer de mama que expresan periostina baja, media y alta.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0025] Se describe en la presente un anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a la periostina, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este comprende: (a) una CDR1 de la cadena pesada de inmunoglobulina (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 1 (GYTFTSYG); (b) una CDR2 de la cadena pesada de inmunoglobulina (CDR-H2) que comprende una secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 2 (ISAYNGNT), 3 (ISAYSGNT), 4 (ISAYQGNT), 5 (ISAYTGNT) o 6 (ISAYDGNT); (c) una CDR3 de la cadena pesada de inmunoglobulina (CDR-H3) que comprende una secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 7 (DILVVPFDY), 8 (DVLVVPFDY) o 9 (DMLVVPFDY); (d) una CDR1 de la cadena liviana de inmunoglobulina (CDR-L1) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 10 (SSDIGSNR); (e) una CDR2 de la cadena liviana de inmunoglobulina (CDR-L2) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 11 (SND); y (f) una CDR3 de la cadena liviana de inmunoglobulina (CDR-L3) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 12 (AAWDDSLSTYV).

[0026] Se describe en la presente un anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a la periostina, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una, dos, tres, cuatro, cinco o seis cualesquiera de: (a) una CDR1 de la cadena pesada de inmunoglobulina (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 1 (GYTFTSYG); (b) una CDR2 de la cadena pesada de inmunoglobulina (CDR-H2) que comprende una secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 16 (ISAYXGNT); (c) una CDR3 de la cadena pesada de inmunoglobulina (CDR-H3) que comprende una secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 17 (DXLVVPFDY); (d) una CDR1 de la cadena liviana de inmunoglobulina (CDR-L1) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 10 (SSDIGSNR); (e) una CDR2 de la cadena liviana de inmunoglobulina (CDR-L2) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 11 (SND); y (f) una CDR3 de la

cadena liviana de inmunoglobulina (CDR-L3) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 12 (AAWDDSLSTYV), en donde X es cualquier residuo de aminoácidos.

[0027] Se describe en la presente un anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a la periostina, que comprende una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de la cadena liviana de inmunoglobulina: (a) en donde la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o que es 100 % idéntica a la que se establece en SEQ ID NO: 13; y (b) en donde la región variable de la cadena liviana de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o que es 100 % idéntica a la que se establece en SEQ ID NO: 14; en donde el residuo de aminoácido número 55 de SEQ ID NO: 13 es asparagina, serina, glutamina, treonina o ácido aspártico, o en donde el residuo de aminoácido número 100 de SEQ ID NO: 13 es metionina, isoleucina o valina.

[0028] Se describe en la presente un anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a la periostina, que comprende una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de la cadena liviana de inmunoglobulina: (a) en donde la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o que es 100 % idéntica a la que se establece en SEQ ID NO: 13; y (b) en donde la región variable de la cadena liviana de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o que es 100 % idéntica a la que se establece en SEQ ID NO: 14.

[0029] Se describe en la presente un anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a la periostina, que comprende una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de la cadena liviana de inmunoglobulina: (a) en donde la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la que se establece en SEQ ID NO: 13; y (b) en donde la región variable de la cadena liviana de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la que se establece en SEQ ID NO: 14.

[0030] Se describe en la presente un anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija al dominio de fasciclina 2 (FAS2) de la periostina. En

ciertas formas de realización, el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este, cuando está fijado a la periostina, entra en contacto con un residuo de aminoácido seleccionado de los aminoácidos 276 a 302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de realización, el anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este, cuando está fijado a la periostina, entra en contacto con uno de los siguientes residuos de aminoácidos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 y SEQ ID NO: 15.

[0031] En la siguiente descripción, se exponen ciertos detalles específicos para proporcionar una comprensión exhaustiva de diversas formas de realización. Sin embargo, una persona del oficio de nivel medio entenderá que las formas de realización proporcionadas pueden ponerse en práctica sin estos detalles. A menos que el contexto requiera lo contrario, en toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, la palabra "comprender" y sus variaciones, tales como "comprende" y "que comprende", deben interpretarse en un sentido abierto e inclusivo, es decir, como "que incluye, entre otros". Como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen los referentes plurales, a menos que el contenido indique claramente lo contrario. También debe tenerse en cuenta que el término "o" se emplea generalmente en un sentido que incluye "y/o" a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Además, los títulos proporcionados en la presente son solo por conveniencia y no interpretan el alcance o el significado de las formas de realización reivindicadas.

[0032] Como se usa en la presente, la expresión "alrededor de" se refiere a una cantidad que está a una cercanía de 10 % o menos de la cantidad indicada.

[0033] Como se usa en la presente, el término "individuo", "paciente" o "sujeto" se refiere a individuos diagnosticados con, que se sospecha que están afectados con, o en riesgo de desarrollar al menos una enfermedad para la cual las composiciones y el método descritos son útiles para tratar. En ciertas formas de realización, el individuo es un mamífero. En ciertas formas de realización, el mamífero es un ratón, rata, conejo, perro, gato, caballo, vaca, oveja, cerdo, cabra, llama, alpaca o yak. En ciertas formas de realización, el individuo es un ser humano.

[0034] Como se usa en la presente, el término "tratar" o la expresión "que trata" se refiere a las intervenciones al estado fisiológico o patológico de un individuo diseñadas, o cuyo objetivo es, mejorar al menos un signo o síntoma asociado con dicho estado fisiológico o patológico. La persona del oficio de nivel medio reconocerá que, dada una población heterogénea de individuos que padecen una enfermedad, no todos los

individuos responderán de la misma manera, o en absoluto, a un tratamiento dado. Se consideran a los individuos para su tratamiento independientemente de cualquier criterio de respuesta objetivo.

[0035] Entre los anticuerpos proporcionados están los anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos y anticuerpos polirreactivos) y fragmentos de anticuerpos. Los anticuerpos incluyen conjugados de anticuerpos y moléculas que comprenden los anticuerpos, tales como moléculas quiméricas. Por lo tanto, un anticuerpo incluye, entre otros, anticuerpos nativos y de longitud completa, así como fragmentos y porciones de estos que retienen las especificidades de fijación de estos, tales como cualquier porción de fijación específica de estos, incluso los que tienen cualquier cantidad de isotipos y/o clases de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE e IgM); y fragmentos biológicamente relevantes (de fijación al antígeno) o porciones de fijación específica de estos, incluso, entre otros, Fab, F(ab')₂, Fv y scFv (entidad monocatenaria o relacionada). Un anticuerpo monoclonal es generalmente uno dentro de una composición de anticuerpos sustancialmente homogéneos; por lo tanto, cualesquier anticuerpos individuales comprendidos dentro de la composición de anticuerpos monoclonales son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que puedan estar presentes en cantidades menores. Un anticuerpo policlonal es una preparación que incluye diferentes anticuerpos de diversas secuencias que se dirigen generalmente contra dos o más determinantes diferentes (epítomos). El anticuerpo monoclonal puede comprender una región constante de IgG1 humana. El anticuerpo monoclonal puede comprender una región constante de IgG4 humana.

[0036] El término "anticuerpo" en la presente se usa en el sentido más amplio e incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, incluso anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpos funcionales (de fijación al antígeno) de estos, incluso fragmentos de fijación al antígeno (Fab) de fragmentos, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fv, fragmentos de IgG recombinante (rIgG), fragmentos de anticuerpos monocatenarios, incluso fragmentos variables monocatenarios (sFv o scFv) y fragmentos de anticuerpos de dominio único (por ejemplo, sdAb, sdFv, nanocuerpo). El término abarca formas de inmunoglobulinas diseñadas por ingeniería genética y/o modificadas de otro modo, tales como intracuerpos, pepticuerpos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos completamente humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos heteroconjugados, anticuerpos multiespecíficos, por

ejemplo, biespecíficos, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos, di-scFv en tándem, tri-scFv en tándem. A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que el término "anticuerpo" incluye fragmentos de anticuerpos funcionales de este. El término también abarca anticuerpos intactos o de longitud completa, incluso anticuerpos de cualquier clase o subclase, incluso IgG y subclases de estas, IgM, IgE, IgA e IgD. El anticuerpo puede comprender una región constante de IgG1 humana. El anticuerpo puede comprender una región constante de IgG4 humana.

[0037] Se sabe en la técnica que la expresión "región determinante de la complementariedad" y el término "CDR", que son sinónimos de "región hipervariable" o "HVR", se refieren a secuencias no contiguas de aminoácidos dentro de regiones variables de anticuerpos, que confieren especificidad y/o afinidad de fijación al antígeno. En general, hay tres CDR en cada región variable de la cadena pesada (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) y tres CDR en cada región variable de la cadena liviana (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). Se sabe en la técnica que "regiones marco" y "FR" se refieren a las porciones no CDR de las regiones variables de las cadenas pesada y liviana. En general, hay cuatro FR en cada región variable de la cadena pesada de longitud completa (FR-H1, FR-H2, FR-H3 y FR-H4), y cuatro FR en cada región variable de la cadena liviana de longitud completa (FR-L1, FR-L2, FR-L3 y FR-L4). Los límites precisos de la secuencia de aminoácidos de una CDR o FR dada pueden determinarse fácilmente con cualquiera de varios esquemas conocidos, incluso los descritos por Kabat *et al.* (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (esquema de numeración "Kabat"); Al-Lazikani *et al.*, (1997) JMB 273,927-948 (esquema de numeración "Chothia"); MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography", J. Mol. Biol. 262, 732-745. (Esquema de numeración "Contact"); Lefranc MP *et al.*, "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains", Dev Comp Immunol, enero de 2003; 27(1): 55-77 (esquema de numeración "IMGT"); Honegger A y Plückthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool", J Mol Biol, 8 de junio de 2001; 309(3):657-70, (esquema de numeración "Aho"); y Whitelegg NR y Rees AR, "WAM: an improved algorithm for modelling antibodies on the WEB", Protein Eng., dic. de 2000; 13(12):819-24 (esquema de numeración "AbM").

[0038] Los límites de una CDR o FR dada pueden variar según el esquema utilizado para la identificación. Por ejemplo, el esquema Kabat se basa en alineamientos

estructurales, mientras que el esquema Chothia se basa en información estructural. La numeración de los esquemas Kabat y Chothia se basa en las longitudes de secuencia de región de anticuerpos más comunes, en donde las inserciones están acomodadas por letras de inserción, por ejemplo, "30a", y en donde aparecen eliminaciones en algunos anticuerpos. Los dos esquemas colocan ciertas inserciones y eliminaciones ("indeles") en diferentes posiciones, lo que da como resultado una numeración diferencial. El esquema Contact se basa en el análisis de estructuras cristalinas complejas y es similar en muchos aspectos al esquema de numeración Chothia.

[0039] La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena liviana o pesada de anticuerpo que está implicado en la fijación del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena liviana (V_H y V_L, respectivamente) de un anticuerpo nativo tienen generalmente estructuras similares, y cada dominio comprende cuatro regiones marco conservadas (FR) y tres CDR (ver, por ejemplo, Kindt *et al.* Kuby *Immunology*, 6.^a ed., WH Freeman y Co., página 91 (2007)). Un único dominio V_H o V_L puede ser suficiente para conferir especificidad de fijación al antígeno. Además, se pueden aislar anticuerpos que se fijan a un antígeno particular mediante el uso de un dominio V_H o V_L de un anticuerpo que se fija al antígeno para cribar una colección de dominios V_L o V_H complementarios, respectivamente (ver, por ejemplo, Portolano *et al.*, *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991)).

[0040] Entre los anticuerpos proporcionados hay fragmentos de anticuerpos. Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se fija al antígeno al que se fija el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, F_v, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv o sFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. En formas de realización particulares, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpos monocatenarios que comprenden una región variable de la cadena pesada y/o una región variable de la cadena liviana, tal como scFv.

[0041] La expresión "fijación específica" o "fijación", cuando se usa en la presente, se refiere a la fijación mediada por uno o más residuos de aminoácidos de la CDR del anticuerpo o fragmento al que se hace referencia, o uno o más residuos de aminoácidos de la región variable del anticuerpo o fragmento al que se hace referencia. Como se usa en la presente, el término "contacto" o la expresión "en contacto", en

referencia a un anticuerpo que se fija o está fijado a una diana específica, se refiere a un residuo de aminoácido de una región variable o una CDR que se encuentra a 5, 4, 3 o menos angstroms del residuo contactado mencionado. El contacto incluye enlaces de hidrógeno, interacciones de Van der Waal y formación de puentes salinos entre un residuo de aminoácido de la región variable o CDR del anticuerpo y el residuo mencionado.

[0042] Los fragmentos de anticuerpos se pueden preparar mediante diversas técnicas, que incluyen, entre otras, la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción por células huésped recombinantes. En algunas formas de realización, los anticuerpos son fragmentos producidos de forma recombinante, tales como fragmentos que comprenden disposiciones no naturales, tales como aquellos con dos o más regiones de anticuerpos o cadenas unidas por ligadores sintéticos, por ejemplo, ligadores polipeptídicos y/o aquellos que no se producen por digestión enzimática de un anticuerpo intacto natural. En algunos aspectos, los fragmentos de anticuerpos son scFv.

[0043] Un anticuerpo "humanizado" es un anticuerpo en el que todos o sustancialmente todos los residuos de aminoácidos de CDR derivan de CDR no humanas y todos o sustancialmente todos los residuos de aminoácidos de FR derivan de FR humanas. Un anticuerpo humanizado puede incluir opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo no humano se refiere a una variante del anticuerpo no humano que se ha humanizado, por lo general para reducir la inmunogenicidad en seres humanos, sin dejar de conservar la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano parental. En algunas formas de realización, algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado están sustituidos con los residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que derivan los residuos de CDR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

[0044] Entre los anticuerpos proporcionados hay anticuerpos humanos. Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo con una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana, o una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos, incluso colecciones de anticuerpos humanos. La expresión excluye las formas humanizadas de anticuerpos no humanos que comprenden regiones de fijación al antígeno no humanas, tales como aquellas en las

que todas o sustancialmente todas las CDR son no humanas.

[0045] Los anticuerpos humanos pueden prepararse administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a la exposición a antígenos. Tales animales contienen por lo general todos o una porción de los locus de inmunoglobulina humana, que reemplazan los locus de inmunoglobulina endógenos, o que están presentes extracromosómicamente o integrados aleatoriamente en los cromosomas del animal. En tales animales transgénicos, los locus de inmunoglobulina endógenos se han inactivado generalmente. Los anticuerpos humanos también pueden derivarse o seleccionarse de colecciones de anticuerpos humanos, incluso colecciones de expresión de fagos y libres de células, que contienen secuencias que codifican anticuerpos derivadas de un repertorio humano. En ciertas formas de realización, un anticuerpo humano puede tener eliminadas las características no deseadas de las secuencias o una mayor afinidad tras sucesivas rondas de selección con un método tal como expresión de fagos.

[0046] Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos y no se limitan a una longitud mínima. Los polipéptidos, incluso los anticuerpos y cadenas de anticuerpos proporcionados y otros péptidos, por ejemplo, ligadores y péptidos de fijación, pueden incluir residuos de aminoácidos que incluyen residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales. Los términos también incluyen modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, sialilación, acetilación, fosforilación y similares. En algunos aspectos, los polipéptidos pueden contener modificaciones con respecto a una secuencia nativa o natural, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como por mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, como por mutaciones de huéspedes que producen las proteínas o errores debidos a la amplificación por PCR.

[0047] En ciertas formas de realización, se proporcionan en la presente anticuerpos con menor función efectora. La frase "función efectora", como se usa en la presente, pretende incluir las capacidades funcionales impartidas por una proteína que contiene Fc al fijarse a un FcγR. Sin limitarse a teoría alguna, la formación de un complejo Fc/FcγR recluta una variedad de células efectoras en sitios de antígeno fijado, lo que da como resultado por lo general diversos eventos de señalización dentro de las células e importantes respuestas inmunitarias posteriores. Función efectora se refiere

tanto a citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo como a citotoxicidad dependiente del complemento. Se pueden realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/agotamiento de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos de fijación al receptor Fc (FcR) para asegurarse de que el anticuerpo carezca de fijación a FcγR (y, por lo tanto, carezca probablemente de actividad de ADCC) pero conserve la capacidad de fijación a FcRn. Se describen ejemplos no limitativos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés en las patentes estadounidenses N.º 5.500.362 y 5.821.337. De manera alternativa, se pueden emplear métodos de ensayos no radioactivos (por ejemplo, ensayos de citotoxicidad no radiactiva ACTI™ y CytoTox 96®). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), monocitos, macrófagos y células *natural killer* (NK).

[0048] El porcentaje (%) de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de polipéptidos de referencia es el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos de referencia, después de alinear las secuencias e introducir espacios, de ser necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos se puede lograr de diversas formas conocidas, por ejemplo, mediante *software* informático disponible públicamente, tal como el *software* BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Se pueden determinar parámetros adecuados para alinear secuencias, incluso algoritmos necesarios para lograr la máxima alineación en la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los fines en la presente, los valores de % de identidad de secuencias de aminoácidos se generan mediante el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc., y el código fuente se ha archivado con la documentación del usuario en la Oficina de derechos de autor de EE. UU., Washington D.C., 20559, donde está registrado con el número de registro de derechos de autor de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede compilarse a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, incluso UNIX digital V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencias son establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

[0049] En situaciones en donde se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencias de aminoácidos de una determinada secuencia de aminoácidos A con una determinada secuencia de aminoácidos B (que, alternativamente, puede expresarse como una determinada secuencia de aminoácidos A que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencias de aminoácidos con una determinada secuencia de aminoácidos B) se calcula de la siguiente manera: 100 veces la fracción X/Y , donde X es la cantidad de residuos de aminoácidos calificados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación de ese programa de A y B, y donde Y es la cantidad total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que, cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencias de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de secuencias de aminoácidos de B con A. A menos que se indique específicamente lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencias de aminoácidos usados en la presente se obtienen como se describen en el párrafo inmediatamente anterior mediante el uso del programa informático ALIGN-2.

[0050] En algunas formas de realización, se contemplan variantes de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en la presente. Una variante se diferencia por lo general de un polipéptido divulgado específicamente en la presente en una o más sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones. Tales variantes pueden ser naturales o pueden generarse sintéticamente, por ejemplo, al modificar una o más de las anteriores secuencias de polipéptidos de la invención y evaluar una o más actividades biológicas del polipéptido como se describe en la presente y/o mediante cualquiera de varias técnicas conocidas. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de fijación y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se pueden preparar variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo mediante la introducción de modificaciones adecuadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo, o mediante síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones y/o sustituciones de residuos, y/o inserciones en estos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede llevar a cabo cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución para obtener el constructo final, siempre que el constructo final posea las características deseadas, por ejemplo, fijación al antígeno.

[0051] En algunas formas de realización, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la

mutagénesis por sustitución incluyen las CDR y FR. Se pueden introducir sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y los productos se pueden cribar en búsqueda de una actividad deseada, por ejemplo, fijación de antígeno retenida/mejorada, inmunogenicidad disminuida o ADCC o CDC mejorada.

[0052] En algunas formas de realización, se pueden producir sustituciones, inserciones o eliminaciones dentro de una o más CDR, en donde las sustituciones, inserciones o eliminaciones no reducen sustancialmente la fijación del anticuerpo al antígeno. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones conservadoras que no reducen sustancialmente la afinidad de fijación en las CDR. Tales alteraciones pueden estar fuera de los "puntos de interés" de CDR. En algunas formas de realización de las secuencias de V_H y V_L variantes, cada CDR está sin alterar.

[0053] Se pueden realizar alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las CDR, por ejemplo, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Dichas alteraciones pueden realizarse en codones que codifican CDR con una alta tasa de mutación durante la maduración somática (ver, por ejemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207: 179-196 (2008)), y la variante resultante puede evaluarse para determinar la afinidad de fijación. Se puede usar maduración de afinidad (por ejemplo, mediante PCR propensa a errores, intercambio de cadenas, aleatorización de CDR o mutagénesis dirigida a oligonucleótidos) para mejorar la afinidad del anticuerpo (ver, por ejemplo, Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (2001)). Los residuos de CDR implicados en la fijación de antígenos pueden identificarse específicamente, por ejemplo, mediante modelado o mutagénesis de barrido de alanina (ver, por ejemplo, Cunningham y Wells, *Science*, 244: 1081-1085 (1989)). En particular, CDR-H3 y CDR-L3 son dianas frecuentes. De manera alternativa o adicional, una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales residuos de contacto y residuos vecinos pueden elegirse como dianas o eliminarse como candidatos para la sustitución. Se pueden cribar variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

[0054] Las inserciones y eliminaciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones del terminal amino y/o carboxilo que varían en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones y eliminaciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos simples o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N-terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión con el terminal N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, ADEPT) o un

polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo. Los ejemplos de variantes de inserción intrasecuencia de las moléculas de anticuerpo incluyen una inserción de 3 aminoácidos en la cadena liviana. Los ejemplos de eliminaciones terminales incluyen un anticuerpo con una eliminación de 7 o menos aminoácidos en un extremo de la cadena liviana.

[0055] En algunas formas de realización, los anticuerpos se alteran para aumentar o disminuir su glicosilación (por ejemplo, al alterar la secuencia de aminoácidos de manera que se creen o eliminen uno o más sitios de glicosilación). Un carbohidrato unido a una región Fc de un anticuerpo puede estar alterado. En general, los anticuerpos nativos de células de mamífero comprenden un oligosacárido biantenarico ramificado unido mediante un enlace N a Asn₂₉₇ del dominio CH2 de la región Fc (ver, por ejemplo, Wright *et al.* *TIBTECH* 15: 26-32 (1997)). El oligosacárido puede ser diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa, ácido siálico, fucosa unida a una GlcNAc en el tallo de la estructura del oligosacárido biantenarico. Se pueden realizar modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo, por ejemplo, para crear variantes de anticuerpos con ciertas propiedades mejoradas. Las variantes de glicosilación de anticuerpos pueden tener una mejor función de ADCC y/o CDC. En algunas formas de realización, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en tal anticuerpo puede ser de 1 % a 80 %, de 1 % a 65 %, de 5 % a 65 % o de 20 % a 40 %. La cantidad de fucosa se determina al calcular la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn₂₉₇, en relación con la suma de todas las glicoestructuras unidas a Asn₂₉₇ (ver, por ejemplo, WO 08/077546). Asn₂₉₇ se refiere al residuo de asparagina ubicado aproximadamente en la posición 297 en la región Fc (numeración EU de los residuos de la región Fc; ver, por ejemplo, Edelman *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mayo de 1969; 63(1):78-85). Sin embargo, Asn₂₉₇ también puede ubicarse alrededor de ± 3 aminoácidos secuencia arriba o secuencia abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia menores en los anticuerpos. Tales variantes de fucosilación pueden tener una mejor función de ADCC (ver, por ejemplo, Okazaki *et al.*, *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); y Yamane-Ohnuki *et al.* *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)). Se pueden usar líneas celulares, por ejemplo, líneas celulares con inactivación, y sus métodos de uso para producir anticuerpos defucosilados, por ejemplo, células Lec13 CHO con deficiencia de fucosilación de proteínas y células CHO con inactivación del gen de la

alfa-1,6-fucosiltransferasa (FUT8) (ver, por ejemplo, Ripka *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006)). También se incluyen otras variantes de glicosilación de anticuerpos (ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 6.602.684).

[0056] En algunas formas de realización, se puede introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en la presente, lo que genera una variante de la región Fc. Una región Fc en la presente es una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. Una región Fc incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

[0057] Los anticuerpos pueden tener mayores semividas y una mejor fijación al receptor Fc neonatal (FcRn) (ver, por ejemplo, US 2005/0014934). Tales anticuerpos pueden comprender una región Fc con una o más sustituciones en esta que mejoran la fijación de la región Fc a FcRn, e incluyen aquellos con sustituciones en uno o más residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434 de acuerdo con el sistema de numeración EU (ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 7.371.826). También se contemplan otros ejemplos de variantes de la región Fc (ver, por ejemplo, Duncan y Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); las patentes estadounidenses N.º 5.648.260 y 5.624.821; y WO94/29351).

[0058] En algunas formas de realización, puede ser deseable crear anticuerpos diseñados por ingeniería genética de cisteína, por ejemplo, "tioMAb", en los que uno o más residuos de un anticuerpo están sustituidos con residuos de cisteína. En algunas formas de realización, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Los grupos tiol reactivos se pueden ubicar en sitios para la conjugación con otras porciones, tales como porciones de fármacos o porciones de ligador fármaco, para crear un inmunoconjugado. En algunas formas de realización, uno o más cualesquiera de los siguientes residuos pueden sustituirse con cisteína: V205 (numeración Kabat) de la cadena liviana; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada.

[0059] En algunas formas de realización, un anticuerpo proporcionado en la presente

se puede modificar adicionalmente para contener porciones no proteicas adicionales que son conocidas y están disponibles. Las porciones adecuadas para la derivatización del anticuerpo incluyen, entre otras, polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitativos de polímeros hidrosolubles incluyen, entre otros, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (ya sea homopolímeros o copolímeros aleatorios), y dextrano o poli(n vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de polipropilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de estos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o no ramificado. La cantidad de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si hay dos o más polímeros unidos, estos pueden ser las mismas moléculas o moléculas diferentes.

[0060] Los anticuerpos descritos en la presente pueden ser codificados por un ácido nucleico. Un ácido nucleico es un tipo de polinucleótido que comprende dos o más bases de nucleótidos. En ciertas formas de realización, el ácido nucleico es un componente de un vector que se puede utilizar para transferir el polinucleótido que codifica el polipéptido en una célula. Como se usa en la presente, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ligó. Un tipo de vector es un vector integrado genómico, o "vector integrado", que puede quedar integrado en el ADN cromosómico de la célula huésped. Otro tipo de vector es un vector "episomal", por ejemplo, un ácido nucleico capaz de realizar replicación extracromosómica. Los vectores capaces de dirigir la expresión de genes a los que están ligados operativamente se denominan en la presente "vectores de expresión". Los vectores adecuados comprenden plásmidos, cromosomas artificiales bacterianos, cromosomas artificiales de levadura, vectores virales y similares. En los elementos reguladores de los vectores de expresión, tales como promotores, potenciadores, se pueden derivar señales de poliadenilación para usar en el control de la transcripción de genes de mamíferos, microbios, virus o insectos. También se puede incorporar la capacidad de replicarse en un huésped, en general conferida por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes. Se pueden emplear vectores derivados de virus, tales como lentivirus, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados y similares. Los vectores de plásmidos se

pueden alinear para su integración en una ubicación cromosómica. Los vectores pueden comprender secuencias que dirigen la integración específica del sitio en una ubicación definida o un conjunto restringido de sitios en el genoma (por ejemplo, recombinación AttP-AttB). Adicionalmente, los vectores pueden comprender secuencias derivadas de elementos transponibles.

[0061] Como se usan en la presente, los términos "homólogo" y "homología" y la expresión "porcentaje de homología", cuando se usan en la presente para describir una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácidos nucleicos, con respecto a una secuencia de referencia, se pueden determinar mediante el uso de la fórmula descrita por Karlin y Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268, 1990, modificado como en Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993). Tal fórmula se incorpora en los programas de herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST) de Altschul *et al.* (J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990). El porcentaje de homología de las secuencias se puede determinar mediante el uso de la versión más reciente de BLAST, a la fecha de presentación de esta solicitud.

[0062] Los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos descritos en la presente pueden usarse para infectar, transfectar, transformar o hacer de otro modo que una célula adecuada sea transgénica para el ácido nucleico, lo cual permite la producción de anticuerpos para usos comerciales o terapéuticos. En la técnica se conocen líneas celulares estándar y métodos para la producción de anticuerpos a partir de un cultivo celular a gran escala. Ver, por ejemplo, Li *et al.*, "Cell culture processes for monoclonal antibody production". *Mabs*. Sept-oct de 2010; 2(5): 466–477. En ciertas formas de realización, la célula es una célula eucariota. En ciertas formas de realización, la célula eucariota es una célula de mamífero. En ciertas formas de realización, la célula de mamífero es una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula de mieloma murino NS0 o una célula PER.C6®. En ciertas formas de realización, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo se integra en un locus genómico de una célula útil para la producción de anticuerpos. En ciertas formas de realización, se describe en la presente un método para elaborar un anticuerpo que comprende cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo en condiciones *in vitro* suficientes para permitir la producción y secreción de dicho anticuerpo.

[0063] En ciertas formas de realización, se describe en la presente un banco de células maestro que comprende: (a) una línea celular de mamífero que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo descrito en la presente integrados en una ubicación genómica; y (b) un crioprotector. En ciertas formas de

realización, el crioprotector comprende glicerol, DMSO o una combinación de estos. En ciertas formas de realización, el banco de células maestro comprende: (a) una línea celular CHO que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo con (i) una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada al menos 90 % idéntica a la que establece SEQ ID NO: 13; y (ii) una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana al menos 90 % idéntica a la que establece SEQ ID NO: 14 que se integra en una ubicación genómica; y (b) un crioprotector. En ciertas formas de realización, el crioprotector comprende glicerol, DMSO o una combinación de estos. En ciertas formas de realización, el banco de células maestro está contenido en un vial o recipiente adecuado para soportar el congelamiento mediante nitrógeno líquido.

[0064] Se describen en la presente métodos para elaborar un anticuerpo descrito en la presente. Tales métodos comprenden incubar una célula o línea celular que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo en un medio de cultivo celular en condiciones suficientes para permitir la expresión y secreción del anticuerpo, y recolectar adicionalmente el anticuerpo del medio de cultivo celular. La recolección puede comprender además una o más etapas de purificación para eliminar células vivas, residuos celulares, polipéptidos o proteínas que no son anticuerpos, sales no deseadas, amortiguadores y componentes del medio. En ciertas formas de realización, las etapas de purificación adicionales incluyen centrifugación, ultracentrifugación, diálisis, desalación, purificación de proteína A, proteína G, proteína A/G o proteína L, y/o cromatografía de intercambio iónico.

Anticuerpos antiperiostina

[0065] Se describen en la presente anticuerpos que inhiben la función de la periostina (POSTN). Dichos anticuerpos son útiles para el tratamiento contra el cáncer. Los anticuerpos descritos en la presente disminuyen el contenido de colágeno de los tumores y reducen la infiltración de los granulocitos y los macrófagos asociados a tumores, mientras que aumentan la polarización del macrófago a un fenotipo M1 y aumentan la acumulación y las propiedades antitumorales de los linfocitos T que infiltran tumores. En ciertas formas de realización, los anticuerpos antiperiostina disminuyen el contenido de colágeno de los tumores al menos alrededor de 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 % o 40 % en comparación con la ausencia de tratamiento o el tratamiento de control. En ciertas formas de realización, los anticuerpos antiperiostina reducen la infiltración de granulocitos y macrófagos asociados a tumores al menos alrededor de 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o 50 % en comparación con la ausencia de tratamiento o el tratamiento de control. En ciertas formas de

realización, los anticuerpos antiperiostina reducen la infiltración de células CD11b+ al menos alrededor de 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o 50 % en comparación con la ausencia de tratamiento o el tratamiento de control. En ciertas formas de realización, los anticuerpos antiperiostina aumentan la polarización de macrófagos asociados a tumores al tipo M1 (CD11b+, MHC de clase II+, CD206-) al menos alrededor de 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o 50 % en comparación con la ausencia de tratamiento o el tratamiento de control. En ciertas formas de realización, los anticuerpos antiperiostina aumentan la acumulación de linfocitos T CD4+ y/o CD8+ en un tumor al menos alrededor de 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o 50 % en comparación con la ausencia de tratamiento o el tratamiento de control. En ciertas formas de realización, los anticuerpos antiperiostina aumentan la producción de interferón gamma de linfocitos T CD8+ que infiltran tumores al menos alrededor de 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o 50 % en comparación con la ausencia de tratamiento o el tratamiento de control.

[0066] Se describe en la presente un anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a la periostina, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este comprende: (a) una CDR1 de la cadena pesada de inmunoglobulina (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 1 (GYTFTSYG); (b) una CDR2 de la cadena pesada de inmunoglobulina (CDR-H2) que comprende una secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 16 (ISAYXGNT); (c) una CDR3 de la cadena pesada de inmunoglobulina (CDR-H3) que comprende una secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 17 (DXLVVPFDY); (d) una CDR1 de la cadena liviana de inmunoglobulina (CDR-L1) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 10 (SSDIGSNR); (e) una CDR2 de la cadena liviana de inmunoglobulina (CDR-L2) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 11 (SND); o (f) una CDR3 de la cadena liviana de inmunoglobulina (CDR-L3) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 12 (AAWDDSLSTYV), en donde X es cualquier aminoácido.

[0067] Se describe en la presente un anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a la periostina, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una, dos, tres, cuatro o cinco regiones determinantes de la complementariedad cualesquiera seleccionadas de: (a) una CDR1 de la cadena pesada de inmunoglobulina (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 1 (GYTFTSYG); (b) una CDR2 de la

cadena pesada de inmunoglobulina (CDR-H2) que comprende una secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 16 (ISAYXGNT); (c) una CDR3 de la cadena pesada de inmunoglobulina (CDR-H3) que comprende una secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 17 (DXLVVPFDY); (d) una CDR1 de la cadena liviana de inmunoglobulina (CDR-L1) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 10 (SSDIGSNR); (e) una CDR2 de la cadena liviana de inmunoglobulina (CDR-L2) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 11 (SND); y (f) una CDR3 de la cadena liviana de inmunoglobulina (CDR-L3) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 12 (AAWDDSLSTYV); en donde X es cualquier aminoácido.

[0068] Se describe en la presente un anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a la periostina, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este comprende: (a) una CDR1 de la cadena pesada de inmunoglobulina (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 1 (GYTFTSYG); (b) una CDR2 de la cadena pesada de inmunoglobulina (CDR-H2) que comprende una secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 2 (ISAYNGNT), 3 (ISAYSGNT), 4 (ISAYQGNT), 5 (ISAYTGNT) o 6 (ISAYDGNT); (c) una CDR3 de la cadena pesada de inmunoglobulina (CDR-H3) que comprende una secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 7 (DILVVPFDY), 8 (DVLVVPFDY) o 9 (DMLVVPFDY); (d) una CDR1 de la cadena liviana de inmunoglobulina (CDR-L1) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 10 (SSDIGSNR); (e) una CDR2 de la cadena liviana de inmunoglobulina (CDR-L2) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 11 (SND); y (f) una CDR3 de la cadena liviana de inmunoglobulina (CDR-L3) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 12 (AAWDDSLSTYV). En ciertas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. En ciertas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG. En ciertas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente pueden comprender una porción Fc con una falta o reducción de función efectora. En ciertas formas de realización, el anticuerpo tiene una IC₅₀ menor de alrededor de 50 nanomolares en un ensayo de adhesión celular realizado con células de fibroblastos de pulmón humano y/o células de fibroblastos de ratón. En ciertas formas de realización, el anticuerpo tiene una IC₅₀ menor de alrededor de 40 nanomolares en un

ensayo de adhesión celular realizado con células de fibroblastos de pulmón humano y/o células de fibroblastos de ratón. En ciertas formas de realización, el anticuerpo tiene una IC50 menor de alrededor de 30 nanomolar en un ensayo de adhesión celular realizado con células de fibroblastos de pulmón humano y/o células de fibroblastos de ratón.

[0069] También se describe en la presente un anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este comprende: (a) una CDR1 de la cadena pesada de inmunoglobulina (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 1 (GYTFTSYG); (b) una CDR2 de la cadena pesada de inmunoglobulina (CDR-H2) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 2 (ISAYNGNT); (c) una CDR3 de la cadena pesada de inmunoglobulina (CDR-H3) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 9 (DMLVVPFDY); (d) una CDR1 de la cadena liviana de inmunoglobulina (CDR-L1) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 10 (SSDIGSNR); (e) una CDR2 de la cadena liviana de inmunoglobulina (CDR-L2) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 11 (SND); y (f) una CDR3 de la cadena liviana de inmunoglobulina (CDR-L3) que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 12 (AAWDDSLSTYV). En ciertas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. En ciertas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG. En ciertas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente pueden comprender una porción Fc con una falta o reducción de función efectora. En ciertas formas de realización, el anticuerpo tiene una IC50 menor de alrededor de 50 nanomolares en un ensayo de adhesión celular realizado con células de fibroblastos de pulmón humano y/o células de fibroblastos de ratón. En ciertas formas de realización, el anticuerpo tiene una IC50 menor de alrededor de 40 nanomolares en un ensayo de adhesión celular realizado con células de fibroblastos de pulmón humano y/o células de fibroblastos de ratón. En ciertas formas de realización, el anticuerpo tiene una IC50 menor de alrededor de 30 nanomolar en un ensayo de adhesión celular realizado con células de fibroblastos de pulmón humano y/o células de fibroblastos de ratón.

[0070] También se describe en la presente un anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija a la periostina, que comprende una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena liviana de inmunoglobulina: (a) en donde la

cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o que es 100 % idéntica a la que se establece en SEQ ID NO: 13; y (b) en donde la cadena liviana de la inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o que es 100 % idéntica a la que se establece en SEQ ID NO: 14, en donde el residuo de aminoácido número 55 de SEQ ID NO: 13 es asparagina, serina, glutamina, treonina o ácido aspártico, y en donde el residuo de aminoácido número 100 de SEQ ID NO: 13 es metionina, isoleucina o valina. En ciertas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG. En ciertas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente pueden comprender una porción Fc con una falta o reducción de función efectora. En ciertas formas de realización, el anticuerpo tiene una IC50 menor de alrededor de 50 nanomolares en un ensayo de adhesión celular realizado con células de fibroblastos de pulmón humano y/o células de fibroblastos de ratón. En ciertas formas de realización, el anticuerpo tiene una IC50 menor de alrededor de 40 nanomolares en un ensayo de adhesión celular realizado con células de fibroblastos de pulmón humano y/o células de fibroblastos de ratón. En ciertas formas de realización, el anticuerpo tiene una IC50 menor de alrededor de 30 nanomolar en un ensayo de adhesión celular realizado con células de fibroblastos de pulmón humano y/o células de fibroblastos de ratón.

[0071] Las regiones de fijación a anticuerpo, incluso las regiones variables y regiones de CDR, descritas en la presente pueden formatearse adecuadamente como parte de un anticuerpo con una función efectora reducida. En ciertas formas de realización, el anticuerpo puede ser un F(ab')₂, que carece de la región Fc. En ciertas formas de realización, el anticuerpo puede comprender una o más mutaciones de la región constante de una cadena pesada del anticuerpo que reducen la función efectora, tal como la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo o la citotoxicidad dependiente del complemento. En ciertas formas de realización, el anticuerpo puede comprender una región constante de IgG4. En ciertas formas de realización, la una o más mutaciones para reducir una o más funciones efectoras del anticuerpo recombinante o fragmento de fijación al antígeno de este comprenden una mutación o conjunto de mutaciones seleccionadas de: N434A, N434H, T307A/E380A/N434A, M252Y/S254T/T256E, 433K/434F/436H, T250Q, T250F, M428L, M428F, T250Q/M428L, N434S, V308W, V308Y, V308F, M252Y/M428L, D259I/V308F, M428L/V308F, Q311V/N434S, T307Q/N434A, E258F/V427T, S228P, L235E, S228P/L235E/R409K, S228P/L235E, K370Q, K370E, eliminación de G446,

eliminación de K447, y cualquier combinación de estos de IgG4 de acuerdo con el sistema de numeración EU. En ciertas formas de realización, el anticuerpo puede comprender una región constante de IgG4 que tiene una mutación correspondiente a S228P de la cadena pesada de acuerdo con el sistema de numeración EU. En ciertas formas de realización, el anticuerpo puede comprender una región constante de IgG4PAA, que tiene mutaciones correspondientes a S228P, F234A y L235A de la cadena pesada de acuerdo con el sistema de numeración EU. Ver Parekh *et al.* "Development and validation of an antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity-reporter gene assay". *MAbs* 1 de mayo de 2012; 4(3): 310–318.

[0072] En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente exhiben menores afinidades con Clq en comparación con un anticuerpo de tipo silvestre correspondiente. En algunas formas de realización, los anticuerpos exhiben afinidades con el receptor de Clq que son al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 5 veces, o al menos 7 veces, o al menos 10 veces, o al menos 20 veces, o al menos 30 veces, o al menos 40 veces, o al menos 50 veces, o al menos 60 veces, o al menos 70 veces, o al menos 80 veces, o al menos 90 veces, o al menos 100 veces, o al menos 200 veces menores que las del anticuerpo de tipo silvestre correspondiente.

[0073] En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente exhiben afinidades con Clq que son al menos 90 %, al menos 80 %, al menos 70 %, al menos 60 %, al menos 50 %, al menos 40 %, al menos 30 %, al menos al menos 20 %, al menos 10 % o al menos 5 % menores que las del anticuerpo de tipo silvestre correspondiente. En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente exhiben afinidades con Clq de alrededor de 100 nM a alrededor de 100 μ M, o de alrededor de 100 nM a alrededor de 10 μ M, o de alrededor de 100 nM a alrededor de 1 μ M, o de alrededor de 1 nM a alrededor de 100 μ M, o de alrededor de 10 nM a alrededor de 100 μ M, o de alrededor de 1 μ M a alrededor de 100 μ M, o de alrededor de 10 μ M a alrededor de 100 μ M. En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente exhiben afinidades con Clq que son mayores de 1 μ M, mayores de 5 μ M, mayores de 10 μ M, mayores de 25 μ M, mayores de 50 μ M o mayores de 100 μ M.

[0074] En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente exhiben menores actividades de CDC en comparación con el anticuerpo Fc de tipo silvestre correspondiente. En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente exhiben actividades de CDC que son al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 50 veces o

al menos 100 veces menores que la del anticuerpo de tipo silvestre correspondiente. En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente exhiben actividades de CDC que son al menos 10 %, o al menos 20 %, o al menos 30 %, o al menos 40 %, o al menos 50 %, o al menos 60 %, o al menos 70 %, o al menos 80 %, o al menos 90 %, o al menos 100 %, o al menos 200 %, o al menos 300 %, o al menos 400 %, o al menos 500 % menores en comparación con el anticuerpo de tipo silvestre correspondiente. En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente no exhiben actividades de CDC detectables. En algunas formas de realización, la reducción y/o ablación de la actividad de CDC pueden atribuirse a la menor afinidad de los anticuerpos descritos en la presente para los ligandos y/o receptores de Fc.

[0075] Se entiende en la técnica que los tratamientos biológicos pueden presentar problemas de toxicidad adversa asociados con la naturaleza compleja de dirigir el sistema inmunitario para que reconozca y ataque células y/o dianas no deseadas. Cuando el reconocimiento y/o el direccionamiento del ataque no tienen lugar donde se requiere el tratamiento, pueden ocurrir consecuencias tales como toxicidad adversa. Por ejemplo, la tinción de anticuerpos de tejidos no diana puede ser indicativo de posibles problemas de toxicidad. En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente exhiben una tinción reducida de tejidos no diana en comparación con el anticuerpo de tipo silvestre correspondiente. En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente exhiben una tinción reducida de tejidos no diana que es al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 5 veces, o al menos 7 veces, o al menos 10 veces, o al menos 20 veces, o al menos 30 veces, o al menos 40 veces, o al menos 50 veces, o al menos 60 veces, o al menos 70 veces, o al menos 80 veces, o al menos 90 veces, o al menos 100 veces, o al menos 200 veces menor que la del anticuerpo de tipo silvestre correspondiente. En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente exhiben una tinción reducida de tejidos no diana que está reducida a razón de al menos 10 %, o al menos 20 %, o al menos 30 %, o al menos 40 %, o al menos 50 %, o al menos 60 %, o al menos 70 %, o al menos 80 %, o al menos 90 %, o al menos 100 %, o al menos 200 %, o al menos 300 %, o al menos 400 %, o al menos 500 % en comparación con el anticuerpo de tipo silvestre correspondiente.

[0076] En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente exhiben una menor toxicidad relacionada con el anticuerpo en comparación con el anticuerpo de tipo silvestre correspondiente. En algunas formas de realización, los

anticuerpos descritos en la presente exhiben toxicidades que son al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 5 veces, o al menos 7 veces, o al menos 10 veces, o al menos 20 veces, o al menos 30 veces, o al menos 40 veces, o al menos 50 veces, o al menos 60 veces, o al menos 70 veces, o al menos 80 veces, o al menos 90 veces, o al menos 100 veces, o al menos 200 veces menores que la del anticuerpo de tipo silvestre correspondiente. En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente exhiben toxicidades que se reducen en al menos 10 %, o al menos 20 %, o en al menos 30 %, o en al menos 40 %, o en al menos 50 %, o en al menos 60 %, o en al menos 70 %, o en al menos 80 %, o en al menos 90 %, o en al menos 100 %, o en al menos 200 %, o en al menos 300 %, o en al menos 400 %, o en al menos 500 % con respecto al anticuerpo de tipo silvestre correspondiente.

[0077] Se entiende en la técnica que los tratamientos biológicos pueden tener como efecto adverso la agregación de trombocitos. Se podrían usar ensayos *in vitro* e *in vivo* para medir la agregación de trombocitos. En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente exhiben una agregación de trombocitos reducida en un ensayo *in vitro* en comparación con el anticuerpo de tipo silvestre correspondiente. En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente exhiben una agregación de trombocitos reducida en un ensayo *in vitro* que es al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 5 veces, o al menos 7 veces, o al menos 10 veces, o al menos 20 veces, o al menos 30 veces, o al menos 40 veces, o al menos 50 veces, o al menos 60 veces, o al menos 70 veces, o al menos 80 veces, o al menos 90 veces, o al menos 100 veces, o al menos 200 veces menor que la del anticuerpo de tipo silvestre correspondiente. En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente exhiben una agregación de trombocitos reducida en un ensayo *in vitro* que se reduce en al menos 10 %, o al menos 20 %, o en al menos 30 %, o en al menos 40 %, o en al menos 50 %, o en al menos 60 %, o en al menos 70 %, o en al menos 80 %, o en al menos 90 %, o en al menos 100 %, o en al menos 200 %, o en al menos 300 %, o en al menos 400 %, o en al menos 500 % en comparación con el anticuerpo de tipo silvestre correspondiente.

[0078] En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente exhiben una agregación de trombocitos *in vivo* reducida en comparación con el anticuerpo de tipo silvestre correspondiente. En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente exhiben una agregación de trombocitos reducida en un ensayo *in vivo* que es al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 5 veces, o al menos 7 veces, o al menos 10 veces, o al menos 20 veces, o al menos 30

veces, o al menos 40 veces, o al menos 50 veces, o al menos 60 veces, o al menos 70 veces, o al menos 80 veces, o al menos 90 veces, o al menos 100 veces, o al menos 200 veces menos que el anticuerpo de tipo silvestre correspondiente. En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente exhiben una agregación de trombocitos reducida en un ensayo *in vivo* que se reduce en al menos 10 %, o al menos 20 %, o en al menos 30 %, o en al menos 40 %, o en al menos 50 %, o en al menos 60 %, o en al menos 70 %, o en al menos 80 %, o en al menos 90 %, o en al menos 100 %, o en al menos 200 %, o en al menos 300 %, o en al menos 400 %, o en al menos 500 % con respecto al anticuerpo de tipo silvestre correspondiente.

[0079] En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente exhiben activación plaquetaria y/o agregación plaquetaria reducida en comparación con el anticuerpo de tipo silvestre correspondiente.

Epítomos fijados mediante anticuerpos contra periostina terapéuticamente útiles

[0080] Se describe en la presente un epítopo o región único de periostina humana que, cuando está fijado, inhibe la actividad biológica de la periostina (por ejemplo, unión celular mediada por integrina) y altera el microentorno tumoral (remodelación del colágeno y cambios en las células inmunitarias). Esta fijación es una combinación de interacciones débiles (atracción de Van der Waals), medias (fijación de hidrógeno) y fuertes (puente salino) entre un residuo de aminoácido de CDR del anticuerpo y residuos de aminoácidos en la periostina (por ejemplo, residuos de contacto). En ciertas formas de realización, un residuo de contacto es un residuo en la periostina que forma un enlace de hidrógeno con un residuo en un anticuerpo antiperiostina. En ciertas formas de realización, un residuo de contacto es un residuo en la periostina que forma un puente salino con un residuo en un anticuerpo antiperiostina. En ciertas formas de realización, un residuo de contacto es un residuo en la periostina que genera una atracción de Van der Waals con un residuo en un anticuerpo antiperiostina, y está dentro de al menos 5, 4 o 3 ángstroms de este.

[0081] En ciertas formas de realización, los anticuerpos antiperiostina descritos en la presente no se fijan a tenascina C o colágeno tipo I.

[0082] En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo aislado que se fija a uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis de los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de periostina (SEQ ID NO: 15). En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo aislado que se fija a todos los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan

con el anticuerpo en interacciones fuertes o medias. En ciertas formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan con el anticuerpo en interacciones fuertes. En algunas formas de realización, el anticuerpo aumenta la expresión y/o liberación de interferón gamma por parte de los linfocitos T CD8+ en sitios tumorales. En algunas formas de realización, el anticuerpo reduce la acumulación de células mieloides granulocíticas supresoras y/o macrófagos asociados a tumores TAM en tumores infiltrantes. En algunas formas de realización, el anticuerpo aumenta el fenotipo de macrófago proinflamatorio M1 y/o reduce el fenotipo de macrófago M2 en tumores infiltrantes. En algunas formas de realización, el anticuerpo aumenta los linfocitos T CD8+ en los sitios tumorales, disminuye los TAM y aumenta el fenotipo de macrófago proinflamatorio M1 en tumores infiltrantes.

[0083] En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo que comprende CDR con una secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 que se fija a uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis de los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo que comprende CDR con una secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 que se fija a todos los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan con el anticuerpo en interacciones fuertes o medias. En ciertas formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan con el anticuerpo en interacciones fuertes.

[0084] En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo que comprende CDR que difieren de la secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 que se fija a uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis de los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo que comprende CDR que difieren de la secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 11, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 que se fija a uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis de los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan con el anticuerpo en interacciones fuertes o medias. En ciertas formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan con el anticuerpo en interacciones fuertes.

[0085] En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo que comprende CDR que difieren en 1, 2, 3, 4 o 5 residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12, y que se fija a uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis de los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo que comprende CDR que difieren de la secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 que se fija a uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis de los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan con el anticuerpo en interacciones fuertes o medias. En ciertas formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan con el anticuerpo en interacciones fuertes.

[0086] En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo que se fija específicamente a periostina que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada humana o humanizada al menos alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 13; y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana humana o humanizada al menos alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 14 y que se fija a uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis de los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo que se fija específicamente a periostina que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada humana o humanizada al menos alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 13; y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana humana o humanizada al menos alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 14 y que se fija a todos los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan con el anticuerpo en interacciones fuertes o medias. En ciertas

formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan con el anticuerpo en interacciones fuertes.

[0087] En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo que comprende CDR con una secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 y que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada humana o humanizada al menos alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 13; y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana humana o humanizada al menos alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 14 y que se fija a uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis de los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo que comprende CDR con una secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 que se fija a todos los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan con el anticuerpo en interacciones fuertes o medias. En ciertas formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan con el anticuerpo en interacciones fuertes.

[0088] En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo que se fija específicamente a la periostina que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada humana o humanizada al menos alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 13, en donde el residuo de aminoácido número 55 de SEQ ID NO: 13 es asparagina, serina, glutamina, treonina o ácido aspártico, y en donde el residuo de aminoácido número 100 de SEQ ID NO: 13 es metionina, isoleucina o valina; y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana humana o humanizada al menos alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 14 y que se fija a uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis de los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de realización, se describe en la presente un

anticuerpo que se fija específicamente a periostina que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada humana o humanizada al menos alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 13 en donde el residuo de aminoácido número 55 de SEQ ID NO: 13 es asparagina, serina, glutamina, treonina o ácido aspártico, y en donde el residuo de aminoácido número 100 de SEQ ID NO: 13 es metionina, isoleucina o valina; y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana humana o humanizada al menos alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 14 y que se fija a todos los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan con el anticuerpo en interacciones fuertes o medias. En ciertas formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan con el anticuerpo en interacciones fuertes.

[0089] En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo que se fija específicamente a periostina que comprende CDR con una secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada humana o humanizada al menos alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 13 en donde el residuo de aminoácido número 55 de SEQ ID NO: 13 es asparagina, serina, glutamina, treonina o ácido aspártico, y en donde el residuo de aminoácido número 100 de SEQ ID NO: 13 es metionina, isoleucina o valina; y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana humana o humanizada al menos alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 14 y que se fija a uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis de los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo que se fija específicamente a periostina que comprende CDR con una secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada humana o humanizada al

menos alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 13 en donde el residuo de aminoácido número 55 de SEQ ID NO: 13 es asparagina, serina, glutamina, treonina o ácido aspártico, y en donde el residuo de aminoácido número 100 de SEQ ID NO: 13 es metionina, isoleucina o valina; y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana humana o humanizada al menos alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 14 y que se fija a todos los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan con el anticuerpo en interacciones fuertes o medias. En ciertas formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan con el anticuerpo en interacciones fuertes.

[0090] En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo que compite por la fijación con un anticuerpo que comprende CDR con una secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 y que se fija a uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis de los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo que compite con la fijación con un anticuerpo que comprende CDR con una secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 que se fija a todos los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan con el anticuerpo en interacciones fuertes o medias. En ciertas formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan con el anticuerpo en interacciones fuertes.

[0091] En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo que comprende una región de fijación que se superpone al menos parcialmente con la región de fijación de un anticuerpo que comprende CDR con una secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 y que se fija a uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis de los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo que comprende una región de fijación que se superpone al menos parcialmente con la región de fijación de un

anticuerpo que comprende CDR con una secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 que se fija a todos los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan con el anticuerpo en interacciones fuertes o medias. En ciertas formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan con el anticuerpo en interacciones fuertes.

[0092] En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo que compite por la fijación con un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada humana o humanizada al menos alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 13; y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana humana o humanizada al menos alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 14.

[0093] En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo que comprende una región de fijación que se superpone al menos parcialmente con la región de fijación de un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada humana o humanizada al menos alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 13; y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana humana o humanizada al menos alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 14.

[0094] En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo que compite por la fijación con un anticuerpo que comprende CDR con una secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 y que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada humana o humanizada al menos alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 13; y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana humana o humanizada al menos alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %,

alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 14 y que se fija a uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis de los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo que comprende CDR con una secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 que se fija a todos los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan con el anticuerpo en interacciones fuertes o medias. En ciertas formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan con el anticuerpo en interacciones fuertes.

[0095] En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo que comprende una región de fijación que se superpone al menos parcialmente con la región de fijación de un anticuerpo que comprende CDR con una secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 y que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada humana o humanizada al menos alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 13; y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana humana o humanizada al menos alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 14 y que se fija a uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis de los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo que comprende CDR con una secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 que se fija a todos los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan con el anticuerpo en interacciones fuertes o medias. En ciertas formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan con el anticuerpo en interacciones fuertes.

[0096] En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo que compete por la fijación con un anticuerpo que comprende CDR con una secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,

11 y 12 y que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada humana o humanizada al menos alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 13 en donde el residuo de aminoácido número 55 de SEQ ID NO: 13 es asparagina, serina, glutamina, treonina o ácido aspártico, y en donde el residuo de aminoácido número 100 de SEQ ID NO: 13 es metionina, isoleucina o valina; y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana humana o humanizada al menos alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 14 y que se fija a uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis de los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo que comprende CDR con una secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 que se fija a todos los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan con el anticuerpo en interacciones fuertes o medias. En ciertas formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan con el anticuerpo en interacciones fuertes.

[0097] En ciertas formas de realización, se describe en la presente un anticuerpo que comprende una región de fijación que se superpone al menos parcialmente con la región de fijación de un anticuerpo que comprende CDR con una secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 y que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada humana o humanizada al menos alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 13 en donde el aminoácido en el residuo número 55 de SEQ ID NO: 13 es asparagina, serina, glutamina, treonina o ácido aspártico, y en donde el aminoácido en el residuo 100 de SEQ ID NO: 13 es metionina, isoleucina o valina; y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana humana o humanizada al menos alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 14 y que se fija a uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis de los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de

realización, se describe en la presente un anticuerpo que comprende CDR con una secuencia de aminoácidos que se establece en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 que se fija a todos los siguientes residuos: N276, R284, E288, L287, V295 o K302 de SEQ ID NO: 15. En ciertas formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan con el anticuerpo en interacciones fuertes o medias. En ciertas formas de realización, el anticuerpo solo se fija a residuos que participan con el anticuerpo en interacciones fuertes.

Métodos terapéuticos

[0098] Los anticuerpos divulgados en la presente son anticuerpos útiles para el tratamiento de un tipo de cáncer o tumor. El tratamiento se refiere a un método que busca mejorar o aliviar la afección que se trata. Con respecto al tratamiento contra el cáncer, se incluye, entre otros, la reducción del volumen del tumor, la reducción del crecimiento del volumen del tumor, el aumento de la supervivencia libre de progresión o la esperanza de vida global. En ciertas formas de realización, el tratamiento afectará la remisión de un tipo de cáncer que se trata. En ciertas formas de realización, el tratamiento abarca el uso como dosis profiláctica o de mantenimiento que pretende prevenir la recidiva o progresión de un tipo de cáncer o tumor tratado previamente. Las personas del oficio de nivel medio entienden que, si bien un anticuerpo puede ser seguro y eficaz, no todos los individuos responderán por igual a un tratamiento que se administre, sin embargo, estos individuos se consideran tratados.

[0099] Los tumores que se pueden tratar con los anticuerpos descritos en la presente incluyen aquellos que expresan periostina. La periostina es un componente de la matriz extracelular, que es segregada por fibroblastos asociados a cáncer y, como tal, la mayoría de los tumores expresarán o comprenderán periostina. En ciertas formas de realización, el tumor tratado es uno que es positivo para periostina y tiene periostina detectable o se sabe que tiene periostina detectable en función de un análisis de población de tumores similares. En ciertas formas de realización, un tumor con periostina alta es uno que tiene una puntuación IHC de alrededor de 50 o más.

[0100] En ciertas formas de realización, el tipo de cáncer o tumor es un tipo de cáncer o tumor sólido. En ciertas formas de realización, el tipo de cáncer o tumor es un tipo de cáncer o tumor hematológico. En ciertas formas de realización, el tipo de cáncer o tumor comprende tumores de mama, corazón, pulmón, intestino delgado, colon, bazo, riñón, vejiga, cabeza, cuello, ovario, próstata, cerebro, páncreas, piel, hueso, médula ósea, sangre, timo, útero, testículo o hígado. En ciertas formas de realización, los tumores o tipos de cáncer que se pueden tratar con los anticuerpos de la invención

comprenden adenoma, adenocarcinoma, angiosarcoma, astrocitoma, carcinoma epitelial, germinoma, glioblastoma, glioma, hemangioendotelioma, hemangiosarcoma, hematoma, hepatoblastoma, leucemia, linfoma, meduloblastoma, melanoma, neuroblastoma, osteosarcoma, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, sarcoma y/o teratoma. En ciertas formas de realización, el tumor/tipo de cáncer se selecciona del grupo de melanoma lentiginoso acral, queratosis actínica, adenocarcinoma, carcinoma adenoide quístico, adenomas, adenosarcoma, carcinoma adenoescamoso, tumores astrocíticos, carcinoma de glándula de Bartolino, carcinoma de células basales, carcinoma de glándulas bronquiales, carcinoide capilar, carcinoma, carcinosarcoma, colangiocarcinoma, condrosarcoma, cistoadenoma, tumor del seno endodérmico, hiperplasia endometrial, sarcoma del estroma endometrial, adenocarcinoma endometrioide, sarcoma ependimario, sarcoma de Swing, hiperplasia nodular focal, gastrinoma, tumores de células germinales, glioblastoma, glucagonoma, hemangioblastoma, hemangioendotelioma, hemangioma, adenoma hepático, adenomatosis hepática, carcinoma hepatocelular, insulinita, neoplasia intraepitelial, neoplasia intraepitelial de células escamosas, carcinoma invasivo de células escamosas, carcinoma de células grandes, liposarcoma, carcinoma de pulmón, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leiomiomasarcoma, melanoma, melanoma maligno, tumor mesotelial maligno, tumor de la vaina del nervio, meduloblastoma, meduloepitelioma, mesotelioma, carcinoma mucoepidermoide, leucemia mieloide, neuroblastoma, adenocarcinoma neuroepitelial, melanoma nodular, osteosarcoma, carcinoma de ovario, adenocarcinoma seroso papilar, tumores hipofisarios, plasmacitoma, pseudosarcoma, carcinoma de próstata, blastoma pulmonar, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, sarcoma, carcinoma seroso, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células pequeñas, carcinoma de tejidos blandos, tumor secretor de somatostatina, carcinoma escamoso, carcinoma de células escamosas, carcinoma indiferenciado, melanoma uveal, carcinoma verrugoso, carcinoma de vagina/vulva, VIPoma y tumor de Wilms. En ciertas formas de realización, el tumor/tipo de cáncer que se va a tratar con uno o más anticuerpos de la invención comprende cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma colorrectal, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos pre-B, cáncer de vejiga, astrocitoma, preferentemente astrocitoma de grado II, III o IV, glioblastoma, glioblastoma multiforme, cáncer de células pequeñas y cáncer de células no pequeñas, preferentemente cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, melanoma

metastásico, cáncer de próstata metastásico independiente de andrógenos, cáncer de próstata metastásico dependiente de andrógenos, adenocarcinoma de próstata y cáncer de mama, preferentemente cáncer ductal de mama y/o carcinoma de mama. En algunas formas de realización, el cáncer comprende glioblastoma, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de piel, cáncer de estómago, mesotelioma, cáncer de hígado, cáncer de endometrio, cáncer de colon, cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata o cáncer de pulmón. En ciertas formas de realización, el tipo de cáncer tratado con los anticuerpos de esta divulgación comprende glioblastoma. En ciertas formas de realización, el tipo de cáncer tratado con uno o más anticuerpos de esta divulgación comprende cáncer de páncreas. En ciertas formas de realización, el tipo de cáncer tratado con uno o más anticuerpos de esta divulgación comprende cáncer de ovario. En ciertas formas de realización, el tipo de cáncer tratado con uno o más anticuerpos de esta divulgación comprende cáncer de pulmón. En ciertas formas de realización, el tipo de cáncer tratado con uno o más anticuerpos de esta divulgación comprende cáncer de pulmón de células escamosas. En ciertas formas de realización, el tipo de cáncer tratado con uno o más anticuerpos de esta divulgación comprende cáncer de próstata. En ciertas formas de realización, el tipo de cáncer tratado con uno o más anticuerpos de esta divulgación comprende cáncer de colon. En ciertas formas de realización, el tipo de cáncer tratado comprende glioblastoma, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de próstata o cáncer de pulmón. En una cierta forma de realización, el tipo de cáncer es resistente a otro tratamiento. En una cierta forma de realización, el tipo de cáncer tratado es recidivante. En una cierta forma de realización, el tipo de cáncer es glioblastoma, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de próstata o cáncer de pulmón recidivante/resistente.

[0101] En ciertas formas de realización, los anticuerpos se pueden administrar a un sujeto que los necesite por cualquier vía adecuada para la administración de composiciones farmacéuticas que contienen anticuerpos, tales como, por ejemplo, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, intratumoral o intracerebral, etc. En ciertas formas de realización, los anticuerpos se administran por vía intravenosa. En ciertas formas de realización, los anticuerpos se administran por vía subcutánea. En ciertas formas de realización, los anticuerpos se administran por vía intratumoral. En ciertas formas de realización, los anticuerpos se administran en una pauta posológica adecuada, por ejemplo, semanal, dos veces por semana, mensual, dos veces por mes, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez

por mes, etc. En ciertas formas de realización, los anticuerpos se administran una vez cada tres semanas. Los anticuerpos pueden administrarse en cualquier cantidad terapéuticamente eficaz. En ciertas formas de realización, la cantidad aceptable desde el punto de vista terapéutico está entre alrededor de 0,1 mg/kg y alrededor de 50 mg/kg. En ciertas formas de realización, la cantidad aceptable desde el punto de vista terapéutico está entre alrededor de 1 mg/kg y alrededor de 40 mg/kg. En ciertas formas de realización, la cantidad aceptable desde el punto de vista terapéutico está entre alrededor de 5 mg/kg y alrededor de 30 mg/kg. Las cantidades terapéuticamente eficaces incluyen cantidades que son las suficientes para mejorar uno o más síntomas asociados con la enfermedad o aflicción a tratar.

[0102] Los anticuerpos antiperiostina descritos en la presente también son útiles en un método para disminuir el contenido de colágeno en un tumor en un individuo.

[0103] Los anticuerpos antiperiostina descritos en la presente también son útiles en un método para aumentar el fenotipo de macrófago M1 y/o reducir el fenotipo de macrófago M2 en un tumor en un individuo.

[0104] Los anticuerpos antiperiostina descritos en la presente también son útiles en un método para reducir la acumulación de células mieloides granulocíticas supresoras y/o macrófagos asociados a tumores en un individuo.

[0105] Los anticuerpos antiperiostina descritos en la presente también son útiles en un método para aumentar la frecuencia de los linfocitos T CD4+ y/o CD8+ en un tumor de un individuo.

[0106] Los anticuerpos antiperiostina descritos en la presente también son útiles en un método para aumentar la expresión y/o liberación de interferón gamma por parte de los linfocitos T CD8+ en un tumor en un individuo.

[0107] Los anticuerpos descritos en la presente son útiles en la elaboración de un medicamento para disminuir el contenido de colágeno en un tumor en un individuo.

[0108] Los anticuerpos descritos en la presente son útiles en la elaboración de un medicamento para aumentar el fenotipo de macrófago M1 y/o reducir el fenotipo de macrófago M2 en un tumor en un individuo.

[0109] Los anticuerpos descritos en la presente son útiles en la elaboración de un medicamento para reducir la acumulación de células mieloides granulocíticas supresoras y/o macrófagos asociados a tumores en un individuo.

[0110] Los anticuerpos descritos en la presente son útiles en la elaboración de un medicamento para aumentar la frecuencia de los linfocitos T CD4+ y/o CD8+ en un tumor de un individuo.

[0111] Los anticuerpos descritos en la presente son útiles en la elaboración de un medicamento para aumentar la expresión y/o liberación de interferón gamma por parte de los linfocitos T CD8+ en un tumor en un individuo.

Excipientes, portadores y diluyentes aceptables desde el punto de vista farmacéutico

[0112] Los anticuerpos descritos en la presente se pueden proporcionar en forma aislada y purificada, lo suficientemente pura como para la administración a un individuo humano.

[0113] En ciertas formas de realización, los anticuerpos antiperiostina de la presente divulgación se incluyen en una composición farmacéutica que comprende uno o más excipientes, portadores y diluyentes aceptables desde el punto de vista farmacéutico. En ciertas formas de realización, los anticuerpos de la presente divulgación se administran suspendidos en una solución estéril. En ciertas formas de realización, la solución comprende 0,9 % de NaCl o 5 % de dextrosa, glucosa o sacarosa. En ciertas formas de realización, la solución comprende además uno o más de: amortiguadores, por ejemplo, acetato, citrato, histidina, succinato, fosfato, bicarbonato e hidroximetilaminometano (Tris); tensioactivos, por ejemplo, polisorbato 80 (Tween 80), polisorbato 20 (Tween 20) y poloxámero 188; poliol/disacárido/polisacáridos, por ejemplo, glucosa, dextrosa, manosa, manitol, sorbitol, sacarosa, trehalosa y dextrano 40; aminoácidos, por ejemplo, glicina o arginina; antioxidantes, por ejemplo, ácido ascórbico, metionina; o agentes quelantes, por ejemplo, EDTA o EGTA.

[0114] En ciertas formas de realización, los anticuerpos de la presente divulgación se transportan/almacenan liofilizados y se reconstituyen antes de la administración. En ciertas formas de realización, las formulaciones de anticuerpo liofilizadas comprenden un agente volumétrico tal como manitol, sorbitol, sacarosa, trehalosa, dextrano 40 o combinaciones de estos. La formulación liofilizada puede estar contenida en un vial compuesto por vidrio u otro material no reactivo adecuado. Los anticuerpos, cuando se formulan, ya sea que se reconstituyan o no, se pueden amortiguar a un cierto pH, generalmente menor de 7,0. En ciertas formas de realización, el pH puede estar entre 4,5 y 6,5, 4,5 y 6,0, 4,5 y 5,5, 4,5 y 5,0 o 5,0 y 6,0.

[0115] También se describen en la presente kits que comprenden uno o más de los anticuerpos descritos en la presente en un recipiente adecuado y uno o más componentes adicionales seleccionados de: instrucciones de uso; un diluyente, un excipiente, un portador y un dispositivo para la administración.

[0116] En ciertas formas de realización, se describe en la presente un método para

preparar un tratamiento contra el cáncer que comprende mezclar uno o más excipientes, portadores o diluyentes aceptables desde el punto de vista farmacéutico y un anticuerpo de la presente divulgación. En ciertas formas de realización, se describe en la presente un método para preparar un tratamiento contra el cáncer para el almacenamiento o transporte que comprende liofilizar uno o más anticuerpos de la presente divulgación.

EJEMPLOS

[0117] Los siguientes ejemplos ilustrativos son representativos de formas de realización de composiciones y métodos descritos en la presente y no pretenden ser limitativos de ninguna manera.

Ejemplo 1: Generación y cribado de anticuerpos

[0118] Se realizó una campaña de descubrimiento de anticuerpos de expresión de fagos para aislar los aglutinantes contra la periostina con una colección de fagos completamente humana. Brevemente, se realizaron tres rondas de cribado con periostina humana recombinante, periostina de ratón recombinante o combinaciones de estas, con énfasis en la identificación de aglutinantes de reactividad cruzada de ratón. A partir de esta estrategia de cribado, se identificaron 78 secuencias de scFv únicas que reaccionan de manera cruzada con la periostina de ratón y se produjeron en un formato de IgG1 humana para el cribado funcional en un ensayo de unión celular. Ver la **Figura 1**.

[0119] La periostina humana o de ratón recombinante se recubrió en placas de 96 cavidades durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron con PBS y se bloquearon con 2 % de BSA durante 1 hora a 37 °C. Después del bloqueo, se agregaron anticuerpos a las placas y se incubaron durante 30 min a 37 °C. Después de la incubación, se agregaron a las cavidades 50.000 células de fibroblastos de pulmón humano IMR90 o 50.000 células de fibroblastos de ratón MLG y se incubaron durante 2 h a 37 °C. Luego, las placas se lavaron dos veces con PBS y se midió la confluencia de las cavidades con la plataforma IncuCyte. A partir de un cribado de dosis única de alta concentración a 500 nM, se identificaron 21 IgG que tenían una inhibición >50 % como se muestra en la **Figura 1**, y se usaron en los cribados de fijación para determinar las afinidades relativas a periostina humana y de ratón, como se muestra en la **Tabla 1** a continuación.

[0120] Para determinar las afinidades relativas a periostina humana o de ratón recombinante, estas proteínas se recubrieron en placas Maxisorp durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se bloquearon con amortiguador de bloqueo de

caseína durante 1 h a 37 °C. Se agregaron titulaciones de cada anticuerpo a las placas y se dejó que se fijaran durante 1 h a RT. Las placas se lavaron 4x con PBST seguido de incubación con un anticuerpo secundario anti-Fc humano conjugado con HRP durante 30 min a RT. Luego, las placas se lavaron de nuevo con 4x PBST y luego se desarrollaron con sustrato TMB y HCl 1M. De este cribado, se seleccionaron 4 clones (**Tabla 1**, marcados en negrita y cursiva) que tienen valores de EC50 <1 nM de fijación a periostina tanto humana como de ratón.

Tabla 1. Valores de EC50 de fijación a periostina humana y de ratón para las 21 IgG identificadas en el ensayo de unión celular de un solo punto que se muestra en la Figura 1.							
EC50 (nM)	<i>NB0625</i>	<i>NB0627</i>	NB0629	<i>NB0639</i>	NB0640	NB0765	NB0776
HuPOSTN	<i>1,03</i>	<i>0,07</i>	0,09	<i>0,10</i>	9,30	1,08	36,60
MoPOSTN	<i>0,14</i>	<i>0,11</i>	6,08	<i>0,12</i>	6,41	2,41	n.s.
EC50 (nM)	NB0784	NB0791	NB0792	<i>NB0794</i>	NB0798	NB0800	NB0801
HuPOSTN	4,68	n.s.	59,43	<i>0,08</i>	0,48	n.s.	25,16
MoPOSTN	32,76	n.s.	158,50	<i>0,35</i>	62,02	n.s.	22,36
EC50 (nM)	NB0802	NB0803	NB0804	NB0805	NB0806	NB0815	NB0816
HuPOSTN	18,75	19,30	n.s.	n.s.	n.s.	1,05	1,00
MoPOSTN	25,02	27,44	n.s.	n.s.	n.s.	55,79	n.s.
Debe observarse que n.s. indica que no se observó saturación en el ensayo.							

Ejemplo 2: Generación de NB0828 y variantes de secuencia

[0121] Los 4 candidatos se volvieron a evaluar en una respuesta a la dosis en el ensayo de unión celular para determinar los valores de IC50. A partir de este cribado, NB0627 se identificó como una IgG particularmente adecuada (**Tabla 2**).

Tabla 2. Valores de IC50 para los 4 principales aglutinantes/bloqueadores de reactividad cruzada identificados en la Tabla 1 .				
IC50 (nM)	NB0625	NB0627	NB0639	NB0794
HuPOSTN	243,3	22,4	236,8	73,1

[0122] Luego, NB0627 se convirtió en un isotipo IgG4PAA silencioso efector, que generó el candidato principal NB0828. El análisis de secuencia de NB0828 identificó dos características no deseadas de modificación posterior a la traducción en la región VH. El primero, un sitio de desamidación, está ubicado en la CDR-H2, y el segundo, un sitio de oxidación, está ubicado en la CDR-H3. Por lo tanto, en un intento de eliminar estas características no deseadas, se generaron varios mutantes simples y dobles y se midió su fijación y actividad. En la **Tabla 3** se incluye un resumen de los resultados de los valores de IC50 y EC50 para NB0828 y sus variantes.

Tabla 3. Resumen de datos de fijación y funcionales de NB0828 y variantes de NB0828.					
Ensayo	Forma de POSTN	NB0828	NB1003 (N55S)	NB1010 (N55Q)	NB1011 (N55T)
IC50 de CAA (nM)	Human a	24,34	10,75	7,97	15,03
	De ratón	25,97	14,91	19,60	22,31
EC50 de fijación (nM)	Human a	0,12	0,08	0,08	0,07
	De ratón	0,15	0,08	0,10	0,07
Ensayo	Forma de POSTN	NB1015 (N55D)	NB1012 (N55S_M 100I)	NB1014 (N55T_M10 0V)	
IC50 de CAA (nM)	Human a	13,63	n.s.	n.s.	
	De ratón	20,91	42,34	65,08	
EC50 de fijación (nM)	Human a	0,12	2,28	9,47	
	De ratón	0,18	4,42	19,27	
Debe observarse que n.s. indica que no se observó saturación en el ensayo.					

Ejemplo 3: Eficacia in vivo de NB0828 en modelos de tumor MB49 de vejiga y CT26 de colon de ratón

[0123] La eficacia de NB0828 se evaluó en dos modelos de tumor separados, los modelos de tumor MB49 de vejiga y CT26 de colon. Brevemente, se inyectaron 250.000 células MB49 por vía intradérmica en el flanco de ratones C57BL/6 hembra, o se inyectaron 50.000 células CT26 por vía intradérmica en el flanco de ratones Balb/c hembra. Tres días después de la implantación del tumor, los ratones se trataron por vía intraperitoneal con NB0828 (50 mg/kg, 3QW) o control de vehículo (PBS). El volumen del tumor se evaluó dos veces por semana después de la medición del calibre y se calculó como $(\text{longitud} \times \text{ancho}^2)/2$. Los ratones se sometieron a eutanasia cuando el tamaño del tumor superaba los 15 mm en cualquier dirección única o debido a la ulceración del tumor como criterio de valoración humanitario.

[0124] Como se muestra en la **Figura 2** (MB49) y en la **Figura 5** (CT26), NB0828 tuvo un efecto en la reducción del crecimiento tumoral en ambos modelos. En el modelo MB49, esta reducción en el crecimiento tumoral se asoció con una menor frecuencia de células mieloides granulocíticas intratumorales como se muestra en la **Figura 3**, y un menor contenido de colágeno, como se muestra en la **Figura 4**. Al igual que con el modelo MB49, el modelo CT26 mostró una reducción en las células mieloides

granulocíticas. Además, NB0828 redujo la frecuencia de macrófagos que infiltran tumores, y los macrófagos que estaban presentes estaban sesgados hacia un fenotipo M1 como resultado del tratamiento con NB0828, como se muestra en la **Figura 6**. En el modelo de ratón CT26, el tratamiento con NB0828 también se asoció con una mayor frecuencia de linfocitos T CD8+ y CD4+ que infiltran tumores, y una mayor función de los linfocitos T CD8+, según se mide mediante la mayor expresión de interferón gamma como se muestra en la **Figura 7**.

Inmunofenotipificación

[0125] Los ratones con tumor MB49 o CT26 se trataron con NB0828 o control de vehículo a partir del día 3 como se describió. Para los datos mostrados, la inmunofenotipificación se llevó a cabo el día 20 y el día 18 después de la implantación del tumor para MB49 y CT26, respectivamente. Los tumores se extirparon, se les retiró la piel y se rompieron mecánicamente con una hoja de bisturí antes de ser digeridos enzimáticamente con la mezcla de enzimas de disociación de tumores de ratón Miltenyi. Las muestras digeridas se pasaron a través de un filtro de 40 µm, se lavaron en RPMI, seguido de un segundo lavado en RPMI + 10 % de FBS. Luego, las células se volvieron a suspender para el recuento y se colocó en placas un máximo de 2×10^6 leucocitos por muestra y se tiñó para el análisis mediante citometría de flujo. Para la evaluación de la función de los linfocitos CD8+ que infiltran tumores en el modelo CT26, se estimularon suspensiones de células individuales digeridas de tumores con péptido AH1 [epítipo de MuLV de gp70 (423-431) restringido a H2-L^d, el epítipo de linfocitos T CD8+ inmunodominante expresado por parte de las células CT26] en presencia de anti-CD28 y brefeldina A durante 5 horas a 37 °C. Después de la estimulación, las células se tiñeron para detectar la producción de IFN-γ por parte de los linfocitos T CD8+ con citometría de flujo mediante métodos estándar de tinción superficial/intracelular. Los paneles de tinción de flujo utilizados para evaluar las poblaciones de células mostradas se incluyen a continuación en la **Tabla 4**. Se usó un tinte de viabilidad (Thermo Fisher, Live/Dead Fixable Violet Stain) para permitir la examinación de solo eventos de células vivas y se incluyó el marcador de pan leucocitos CD45 para permitir la normalización de las poblaciones dentro del compartimento inmunitario. Las poblaciones inmunitarias de interés se definieron fenotípicamente/funcionalmente de la siguiente manera: Células mieloides totales (CD45+ CD11b+), granulocitos (CD45+ CD11b+ Gr-1 hi o CD45+ CD11b+ Ly6G+ Ly6C lo), macrófagos (CD45+ CD11b+ Ly6G- Ly6C lo/neg F4/80+), macrófagos M1 (MHC II+ CD206-), macrófagos M2 (MHC II- CD206+), CD8+ TIL (CD45+ CD11b-

CD3+ CD90.2+ CD8+), CD4+ TIL (CD45+ CD11b- CD3+ CD90.2+ CD4+), IFN- γ + CD8+ TIL (CD45+ CD11b- CD3+ CD8+ IFN- γ +). La mediana de intensidad de fluorescencia (MFI) se usó para la determinación de la intensidad de tinción de IFN- γ a partir de IFN- γ + CD8+ TIL.

Tabla 4. Cócteles de anticuerpos utilizados para evaluar el fenotipo/la función de las células inmunitarias en tumores MB49 y CT26				
Panel de tinción MB49				
MHC II – AF488	iNOS-PE	CD11b-PerCP-Cy5.5	PD-1-PE-Cy7	Arginasa-1-APC
Gr-1-AF700	CD45-APC-Fire-750	Live/Dead Violet	F4/80 BV510	CD206 BV650
Panel de tinción CT26 - Análisis de TIL				
CD3-AF488	PDGFR- α -PE	CD8a-PerCP-Cy5.5	PD-1-PE-Cy7	AH-1 tetrámero-APC
CD90.2-AF700	CD45-APC-Fire-750	Live/Dead Violet	CD4-BV510	CD11b-BV650
Panel de tinción CT26 - Función de TIL				
CD3-AF488	IFN- γ -PE	CD8a-PerCP-Cy5.5	PD-1-PE-Cy7	IL-2-AF647
TNF-AF700	CD45-APC-Fire-750	Live/Dead Violet	CD4-BV510	CD11b-BV650
Panel de tinción CT26 - Células mieloides				
MHC II – AF488	PD-L1-PE	CD11b-PerCP-Cy5.5	Ly6C-PE-Cy7	F4/80-AF647
Ly6G-AF700	CD45-APC-Fire-750	Live/Dead Violet	CD40 BV510	CD206 BV650

Contenido de colágeno

[0126] El contenido de colágeno total de los tumores se evaluó mediante la cuantificación de hidroxiprolina con el ensayo de colágeno total Quickzyme. Para la preparación de las muestras, se extirparon tumores MB49 de ratones con tumor cuando los tumores habían alcanzado el criterio de valoración y se los congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se los almacenó a -80 °C antes del análisis. El material tumoral se pesó y se volvió a suspender en HCl 6 M a 200 mg de tumor/ml de HCl, se agitó en vórtice y se incubó a 95 °C durante 20 h. Los tubos se enfriaron, se centrifugaron a 13.000 RPM durante 10 minutos y se recolectó el sobrenadante. Los sobrenadantes se diluyeron en agua Milli Q, seguido de HCl 4 M de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante y se colocaron en placas en duplicados técnicos para la detección de hidroxiprolina con los amortiguadores y reactivos de detección suministrados. Se midieron los valores de OD570nm y se compararon con una curva estándar generada con colágeno suministrado para calcular la cantidad de colágeno en cada muestra. El colágeno total calculado (μ g) para cada muestra se dividió por la masa total de entrada de tumor (mg) para normalizar los datos en las

muestras de tumor.

Ejemplo 4: Eficacia in vivo de NB0828 en el modelo de tumor MC38 de colon de ratón

[0127] Se evaluó la eficacia de NB0828 en la reducción del crecimiento tumoral en el modelo de tumor MC38 de colon de ratón con los resultados mostrados en la **Figura 8**. Brevemente, se inyectaron 200.000 células MC38 por vía intradérmica en el flanco de ratones C57BL/6 hembra. Tres días después de la implantación del tumor, los ratones se trataron por vía intraperitoneal con NB0828 (50 mg/kg, 3QW) o control de vehículo (PBS). Para la disminución de los linfocitos T CD8+, se administraron anti-CD8a de ratón (clon 2.43) o control de isotipo de IgG (clon LTF-2) junto con NB0828 para las primeras 6 dosis (10 mg/kg, 3QW). La disminución de los linfocitos T se confirmó en la sangre mediante citometría de flujo con el panel de tinción de flujo que se enumera en la Tabla 5. El volumen del tumor se midió con el mismo método que se describe para los modelos MB49 y CT26. NB0828 fue eficaz para reducir el crecimiento tumoral en el modelo MC38 (**Figura 8**). NB0828 también fue eficaz para alterar el microentorno tumoral para aumentar los linfocitos T CD8+, disminuir la frecuencia de macrófagos asociados a tumores (TAM) y aumentar la relación de macrófagos proinflamatorios, como se muestra en las **Figuras 9A y 9C**. La eficacia de NB0828 para reducir el crecimiento tumoral en este modelo dependía de los linfocitos T CD8+ ya que la disminución de los linfocitos T CD8+ durante el tratamiento con NB0828 revirtió el efecto beneficioso de NB0828, como se muestra en **9D**. En general, estos datos indican que NB0828 reduce eficazmente el crecimiento tumoral y aumenta los linfocitos T CD8+ en los sitios tumorales, disminuye los TAM y aumenta el fenotipo de macrófago proinflamatorio M1 en tumores infiltrantes.

Inmunofenotipificación

[0128] Los tumores se extirparon, se les retiró la piel, y se rompieron mecánicamente con una hoja de bisturí antes de ser digeridos enzimáticamente con la mezcla de enzimas de disociación de tumores de ratón Miltenyi (incubación de 45 min en una plataforma de agitación a 37 °C). Las muestras digeridas se pasaron a través de un filtro de 40 µm, se lavaron en RPMI, seguido de un segundo lavado en RPMI + 10 % de FBS. Luego, las células se volvieron a suspender para el recuento y se colocó en placas un máximo de 2×10^6 leucocitos por muestra y se tiñó para el análisis mediante citometría de flujo. Para la evaluación de la función de los linfocitos que infiltran tumores CD8+ (CD8+ TIL) en el modelo MC38, se estimularon suspensiones de células individuales digeridas de tumores (máximo 2×10^6 leucocitos por muestra) con

péptido p15E [epítipo de MuLV p15E (604-611) restringido a H2-K^b expresado por los tumores MC38] en presencia de anti-CD28 y brefeldina A durante 5 horas a 37 °C. Después de la estimulación, las células se tiñeron para detectar la producción de IFN- γ por parte de los linfocitos T CD8+ con citometría de flujo mediante métodos estándar de tinción superficial/intracelular con el conjunto de amortiguadores eBioscience Intracellular Fix & Perm. Los paneles de tinción de flujo utilizados para evaluar las poblaciones de células mostradas se incluyen en la tabla a continuación. Se usó un tinte de viabilidad (Thermo Fisher, Live/Dead Fixable Violet Stain) para permitir la examinación de solo eventos de células vivas y se incluyó el marcador de pan leucocitos CD45 para permitir la normalización de las poblaciones dentro del compartimento inmunitario. Para los estudios en MC38, las poblaciones inmunitarias de interés informadas se definieron fenotípicamente/funcionalmente de la siguiente manera: Células mieloides totales (CD45+ CD11b+), macrófagos (CD45+ CD11b+ Ly6G- Ly6C lo/neg F4/80+), macrófagos M1 (MHC II+), macrófagos M2 (MHC II-), CD8+ TIL (CD45+ CD11b- CD3+ SSC lo CD8+), IFN- γ + CD8+ TIL (CD45+ CD11b- CD3+ SSC lo CD8+ IFN- γ +).

Tabla 5. Cócteles de anticuerpos utilizados para evaluar el fenotipo y la función de las células inmunitarias en tumores MC38				
Panel MC38 – Células mieloides				
MHC II- AF488	PD-L1-PE	CD11b-PerCP-Cy5.5	Ly6C-PE-Cy7	F4/80-AF647
Ly6G-AF700	CD45-APC-Fire-750	L/D Violet	CD40-BV510	CD206 BV650
Panel MC38 – Linfocitos T				
CD3-AF488	IFN- γ -PE	CD8-PerCp-Cy5.5	PD-1-PE-Cy7	IL-2-AF647
TNF-AF700	CD45-APC-Fire-750	L/D Violet	CD4-BV510	CD11b-BV650
Panel MC38 – Confirmación de disminución de linfocitos T CD8+				
CD3-AF488		CD8-PerCp-Cy5.5		
	CD45-APC-Fire-750	L/D Violet	CD4-BV510	CD11b-BV650

Ejemplo 5: NB0828 se fija al dominio de FAS2 de periostina (POSTN)

[0129] Se investigó la región de fijación de NB0828 para caracterizar adicionalmente el anticuerpo.

Generación de proteínas quiméricas BIGH3/POSTN

[0130] La proteína homóloga más cercana a la periostina en secuencia es la proteína inducida por el factor de crecimiento transformante beta (BIGH3), que tiene una

homología de secuencia de 48 % dentro de las regiones EMI-FAS4 de las proteínas. Aunque la homología de secuencia entre las dos proteínas es baja, la arquitectura del dominio general es muy similar, y comprende un dominio EMI y cuatro dominios de fasciclina (FAS) en tándem. NB0828 se fija con una afinidad alta a la periostina, pero no se fija a BIGH3. Para caracterizar adicionalmente el dominio de fijación de NB0828, se generaron proteínas quiméricas BIGH3/POSTN, por lo que cada dominio de periostina se reemplazó con el dominio correspondiente de BIGH3, con lo que se generaron cinco quimeras BIGH3/POSTN (**Figura 10**). Los estudios de fijación de NB0828 en estas proteínas se realizaron mediante ELISA. Como se muestra en la **Figura 11A**, NB0828 conserva la fijación a todas las quimeras BIGH3/POSTN, excepto la quimera FAS2. Esta pérdida observable de fijación al reemplazar el dominio POSTN FAS2 con el dominio BIGH3 FAS2 indica que NB0828 se fija al dominio FAS2 de POSTN.

Generación de variantes de POSTN FAS2

[0131] El dominio de FAS2 de la periostina es una estructura conformacional compuesta por 132 aminoácidos. Se generaron variantes de sustitución de un solo aminoácido (alanina) en diversas posiciones a través del dominio de FAS2 para definir aún más el epítipo NB0828 o la región de fijación e identificar los residuos de contacto críticos (Tabla 5). Se identificaron residuos para mutagénesis en función de la exposición en la superficie en MOE, una herramienta de análisis computacional, con la estructura cristalina publicada (Liu *et al*, 2018; PDB N.º 5YJG).

Tabla 5. Variantes de FAS2			
ID de proteína	Sustitución de AA	ID de proteína	Sustitución de AA
NB1187	Q238A	NB1205	R284A
NB1188	D239A	NB1206	G285A
NB1189	E242A	NB1207	E288A
NB1190	D245A	NB1208	M291A
NB1191	D246A	NB1209	K294A
NB1192	S248A	NB1210	E298A
NB1193	S249A	NB1238	T235A
NB1194	F250A	NB1239	L260A
NB1195	R251A	NB1240	D266A
NB1196	I255A	NB1241	F279A
NB1197	T256A	NB1242	K281A
NB1198	D258A	NB1243	L287A
NB1199	E261A	NB1244	R289A
NB1200	R265A	NB1245	D293A
NB1201	P274A	NB1246	V295A
NB1202	N276A	NB1247	S297A
NB1203	E280A	NB1248	K302A
NB1204	P283A		

[0132] En la ronda inicial se generaron 23 variantes de alanina que abarcaban residuos en todo el dominio de FAS2. Se realizaron estudios de fijación de NB0828 en estas variantes y las variantes que tenían una pérdida >50 % de la señal máxima dentro del ensayo se identificaron como residuos que son críticos para la fijación. La **Figura 11B** ilustra los resultados de ese cribado. Se identificaron dos variantes que representaban aminoácidos críticos para la fijación de NB0828: NB1205 (R284A) y NB1207 (E288A). Dada la proximidad de estos dos aminoácidos (**Figura 12**), se generó una segunda ronda de 11 variantes adicionales, que se centró más específicamente en los residuos dentro de esta región. La **Figura 11C** ilustra los resultados del segundo cribado. En función de los resultados de ELISA del segundo cribado, se identificaron cuatro variantes adicionales que representaban aminoácidos críticos para la fijación de NB0828: NB1243 (L287A), NB1246 (V295A), NB1248 (K302A) y NB1202 (N276A). En particular, NB1190 (D245A), que estuvo muy cerca de la pérdida >50 % del corte de señal máxima pero no cayó por debajo, se encuentra en un bucle separado del resto de residuos pero forma un punto de contacto con N276 dentro del dominio de FAS2 y en el bucle de fijación de NB0828 (**Figura 12**). Dado que N276 se identificó como un residuo crítico para la fijación de NB0828, el residuo D245 también puede ser un residuo de contacto para NB0828 o proporcionar integridad estructural al bucle del epítipo NB0828 que es importante para la fijación.

Determinación de la afinidad de NB0828 entre especies

[0133] La afinidad de fijación de NB0828 se determinó entre las especies humana, de ratón, de rata y *Macaca fascicularis*. Las afinidades de NB0828 se determinaron mediante el sistema Octet Red. Brevemente, se usaron biosensores anti-Fc humano (AHC) para capturar NB0828, seguido de la asociación de cantidades de titulación de periostina recombinante humana, de ratón, de rata o de *Macaca fascicularis* (100 nM → 0 nM; diluciones 1:2). La periostina recombinante humana, de ratón y de rata se adquirió comercialmente a través de R&D Systems, mientras que la periostina de *Macaca fascicularis* se elaboró internamente. Los resultados indican que las afinidades de NB0828 a la periostina en las cuatro especies son muy similares, y varían de 0,1-0,5 nM. Estos datos respaldan fuertemente los experimentos de mapeo de epítopos detallados anteriormente, ya que la identidad de secuencia en el bucle de fijación de NB0828 descrito fue de 100 % en las cuatro especies.

Tabla 6. Afinidades de NB0828 a periostina humana, de <i>Macaca fascicularis</i> , de ratón y de rata			
Especie	KD (M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)
HuPOSTN	3,51E-10	7,02E+05	2,46E-04
CynoPOSTN	2,65E-10	7,94E+05	2,11E-04
MoPOSTN	1,14E-10	6,70E+05	7,64E-05
RatPOSTN	5,40E-10	7,27E+05	3,93E-04

Ejemplo 6: NB0828 no bloquea la fijación de la periostina a la tenascina C y al colágeno de tipo 1, pero bloquea la unión celular

[0134] Para determinar si NB0828 bloquea la fijación de periostina a proteínas extracelulares, tenascina C y colágeno de tipo I, se realizó un ensayo ELISA competitivo. La periostina humana recombinante (2 ng/ml) se recubrió en placas Maxisorp durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se bloquearon con amortiguador de bloqueo de caseína durante 1 h a 37 °C. Con el fin de determinar la EC₈₀ de fijación para la tenascina C humana recombinante y el colágeno tipo I humano, las proteínas se biotinilaron 10:1 con EZ-Link™ NHS-PEG4-biotina (Fisher), y se agregaron titulaciones de cada proteína biotinilada a las placas y se incubaron durante 1 h a RT. Las placas se lavaron 4x con PBST seguido de detección con avidina-HRP durante 30 min. Luego, las placas se lavaron de nuevo con 4x PBST y se desarrollaron con sustrato TMB y HCl 1M. La EC₈₀ para cada proteína se determinó con el *software* Graphpad Prism 7. Para el ELISA competitivo, se agregaron a la placa titulaciones de NB0828, IgG de control o PBST y se incubaron durante 30 min con agitación a RT. Las placas luego se lavaron 4x con PBST y se agregó a la placa la concentración EC₈₀ de fijación de tenascina C biotinilada (0,9 nM, **13A**, izquierda) o colágeno (100 nM, **13B**, izquierda) o un control de bloqueo premezclado. El control de bloqueo premezclado se preparó al mezclar la concentración EC₈₀ de proteína biotinilada con una titulación de periostina humana recombinante, incubada con agitación durante 30 min a RT antes de agregarse a la placa. Las placas luego se incubaron durante 1 h con agitación a RT, y se lavaron, detectaron y desarrollaron como se describió anteriormente.

[0135] La tenascina C y el colágeno de tipo I se fijaron a la periostina con una EC₈₀ de fijación de 0,9 nM y 100 nM, respectivamente (**Figura 13A y 13B**). Como se muestra en la **Figura 13A y 13B**, NB0828 no inhibió la fijación de la periostina a la tenascina C y al colágeno de tipo I, en contraste con el control positivo premezclado. Tomados en conjunto, estos datos indican que NB0828 no bloquea la interacción de la periostina

con las proteínas de la matriz extracelular, la tenascina C y el colágeno de tipo I.

Ejemplo 7: Evaluación inmunohistoquímica (IHC) de la expresión de periostina en indicaciones tumorales humanas

[0136] Para evaluar los niveles de expresión de periostina en diferentes tipos de cáncer humanos, se realizó un estudio de prevalencia de inmunohistoquímica (IHC). Se evaluaron micromatices de tejido (TMA) que comprendían 18 indicaciones tumorales y aproximadamente 750 muestras individuales para determinar la expresión de periostina. Las muestras se tiñeron con anticuerpo antiperiostina EPR20806 (Abcam id de cat: ab215199, id de lote: GR3192974-3) diluido 1:50. La tinción se cuantificó mediante métodos de patología digital (HALO, laboratorios Indica) para calcular una puntuación de IHC (puntuación de IHC = [% de área de tinción de baja intensidad *1] + [% de área de tinción de intensidad intermedia *2] + [% de área de tinción de alta intensidad *3]). Se calculó un punto de corte para la tinción de periostina alta/baja como una puntuación de IHC de periostina de 50, en función de la puntuación de IHC de periostina promedio aproximada en todas las muestras. El estudio de prevalencia demostró un rango de tinción de periostina en y dentro de las indicaciones evaluadas, en donde los tipos de cáncer de páncreas, mama y pulmón escamoso mostraron los niveles más altos de tinción de periostina (**Figura 14A**). Los tumores con periostina alta estaban presentes en todas las indicaciones, aunque con diferente frecuencia (**Figura 14A**). En la **Figura 14B** se muestran imágenes de IHC representativas de la expresión de periostina en cáncer de mama. Tomados en conjunto, estos datos demuestran que la periostina se expresa ampliamente en múltiples tipos de tumores.

[0137] Si bien se han mostrado y descrito en la presente formas de realización preferidas de la presente invención, será evidente para las personas del oficio de nivel medio que tales formas de realización se proporcionan solo a modo de ejemplo. A las personas del oficio de nivel medio se les ocurrirán numerosas variaciones, cambios y sustituciones sin apartarse de la invención. Debe entenderse que pueden emplearse diversas alternativas a las formas de realización de la invención descritas en la presente al poner en práctica la invención.

[0138] Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes otorgadas y otros documentos mencionados en esta memoria descriptiva se incorporan en la presente por referencia como si cada publicación, solicitud de patente, patente otorgada u otro documento individual estuviese específica e individualmente indicado como incorporado por referencia en su totalidad. Las definiciones contenidas en el texto

incorporado por referencia se excluyen en la medida en que contradigan las definiciones en esta divulgación.

Listado de secuencias proporcionado en la presente		
SEQ ID NO:	Secuencia	Origen
1	GYTFTSYG	
2	ISAYNGNT	
3	ISAYSGNT	
4	ISAYQGNT	
5	ISAYTGNT	
6	ISAYDGNT	
7	DILVVPFDY	
8	DVLVVPFDY	
9	DMLVVPFDY	
10	SSDIGSNR	
11	SND	
12	AAWDDSLSTYV	
13	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPG QGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMEL RSLRSDDTAVYYCARDMLVVPFDYWGGGTLTVSS	
14	QSVLTQSSSASGTPGQTVTVSCSGSSDIGSNRVNWWYQQLPG TAPKLLIYSNDQRPSPGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSADEA DYYCAAWDDSLSTYVFGSGTKVTVL	
15	MIPFLPMFSLLLLLIVNPINANNHYDKILAHSRIRGRDQGPVCA LQQILGTKKKYFSTCKNWKYSICGQKTTVLYECCPGYMRME GMKGCPAVLPIDHVGTLGIVGATTTQRYSDASKLREEIEGKG SFTYFAPSNEAWDNLDSDIRRGLESNVNVELLNALHSHMINKR MLTKDLKNGMIIPSMYNNLGLFINHYPNGVVTVNCARIIHGNQIA TNGVVHVIDRVL TQIGTSIQDFIEAEDDLSSFRAAAITSDILEALG RDGHFTLFAPTNEAFEKLPRGVLERIMGDKVASEALMKYHILNT LQCSSESIMGGAVFETLEGNTIEIGCDGDSITVNGIKMVNKKDIVT NNGVIHLIDQVLIPDSAKQVIELAGKQQTTFDLVAQLGLASALR PDGEYTLLAPVNNAFSDDTLSMDQRLLKLILQNHILKVKVGLNE LYNGQILETIGGKQLRVFVYRTAVCIENSCMEKGSQGRNGAIH IFREIIPAEKSLHEKLKQDKRFSTFLSLLEAADLKELLTQPGDW TLFVPTNDAFKGMTSEEKEILIRDKNALQNIILYHLTPGVFIGKGF EPGVTNLIKTTQGSKIFLKEVNDTLLVNELKSKESDIMTTNGVIH VVDKLLYPADTPVGNDQLLEILNKLKIYIYIKFVRGSTFKEIPVTV YTTKIITKVVEPKIKVIEGSLQPIIKTEGPTLTKVKIEGEPEFRLIKE GETITEVIHGEPIIKKYTKIIDGVPVEITEKETREERIITGPEIKYTRI STGGGETEETLKLLQEEVTKVTKFIEGGDGHLEFEDDEEIKRLLQ GDTPVRKLQANKKVQGSRRRLREGRSQ	
16	ISAYXGNT	
17	DXLVVPFDY	