(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 395 746**

(51) Int. CI.:

C07K 16/08 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2009 E 09159303 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2012 EP 2248825**

(54) Título: **Fragmentos de enlace de antigeno de un anticuerpo para utilizar en el tratamiento y diagnóstico de enfermedades oculares**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.02.2013

(73) Titular/es:

RIBOVAX BIOTECHNOLOGIES SA (100.0%)
12, avenue des Morgines
1213 Petit-Lancy (Geneva), CH

(72) Inventor/es:

ABADIE, CLAIRE;
COMBETTE, JEAN-MARC;
DELOCHE, CATHERINE y
WILLIAMSON, ROBERT ANTHONY

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

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

DESCRIPCIÓN

Fragmentos de enlace de antígeno de un anticuerpo para utilizar en el tratamiento y diagnóstico de enfermedades oculares

La presente invención se relaciona con el uso de fragmentos de enlace de antígeno de un anticuerpo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad ocular mediante administración tópica.

Estado de la técnica

HSV es un virus de ADN que comúnmente afecta los humanos. La infección ocurre por el contacto directo de la piel o la membrana mucosa con lesiones o secreciones cargadas con el virus. HSV del tipo 1 (HSV-1) es principalmente responsable de infecciones oculares y orofaciales, mientras que el HSV del tipo 2 (HSV-2) generalmente se transmite sexualmente y causa enfermedad genital. HSV-2 puede infectar los ojos por medio de contacto orofacial con lesiones genitales y ocasionalmente se transmite a los recién nacidos a su paso a través del canal del parto de una madre con infección HSV-2 genital.

La infección primaria de HSV-1 ocurre más comúnmente en la distribución monocutánea del nervio trigeminal. Por lo general es asintomático pero se puede manifestar como una infección del tracto respiratorio superior no-específico. Después de la infección primaria, el virus se propaga de las células epiteliales infectadas a los terminales nerviosas sensoriales cercanos y se transporta entre el axón nervioso al cuerpo celular localizado en el ganglio trigeminal. Ahí, el genoma del virus entra al núcleo de una neurona, donde este persiste indefinidamente en un estado latente. La infección primaria de cualquiera de los 3 ramas (i.e. oftálmica, maxilar, mandibular) del nervio cranial V puede conducir a infección latente de células nerviosas en el ganglio trigémino. La propagación interneural de HSV dentro del ganglio permite que los pacientes desarrollen posteriormente una enfermedad ocular sin haber tenido la infección de HSV ocular primaria.

La infección de HSV ocular recurrente tradicionalmente se ha considerado como la reactivación del virus en el ganglio trigémino, que migra abajo del axón del nervio para producir una infección lítica en el tejido ocular. La evidencia sugiere que el virus también puede subsistir latentemente dentro del tejido corneal, sirviendo como otra fuente potencial de enfermedad recurrente y causando enfermedad de HSV derivada del donante en córneas trasplantadas.

La infección por HSV es masiva, con un estimado de un tercio de la población en el mundo que sufre de infecciones recurrentes. Solo en los Estados Unidos, aproximadamente 20,000 nuevos casos de HSV ocular y más de 28,000 reactivaciones ocurren anualmente.

Las infecciones por virus del herpes simplex de los ojos son la principal causa de ceguera debido a la enfermedad infecciosa en países desarrollados.

Las infecciones por virus del herpes simplex de los ojos en particular, se pueden dividir en 4 categorías: queratitis epitelial infecciosa, queratopatía neurotrófica, queratitis estromal, y endotelitis.

El diagnóstico por lo general se hace por motivos clínicos sobre la base de rasgos característicos de la lesión de la córnea y por exclusión. Los estudios de laboratorio pueden ayudar a confirmar la suposición clínica en los casos que carecen de hallazgos típicos, pero no son fácilmente disponibles en la mayoría de entornos clínicos. Los raspados epiteliales con tinción de Giemsa pueden mostrar células multinucleadas gigantes, que resultan de la coalescencia de las células epiteliales de la córnea infectadas e inclusiones virales intranucleares. Sin embargo, los resultados negativos de la citología no excluyen la infección por HSV. Los cultivos virales tienen una buena sensibilidad pero toman varios días en alcanzar un resultado. Las pruebas de detección del antígeno de HSV, tales como el sistema del virus ligado de enzima (ELVIS), son específicas pero se limitan por su baja sensibilidad. El cultivo celular para la confirmación de HSV, por lo tanto es en cualquier caso recomendado cuando el resultado de la prueba de ELVIS es negativo de nuevo, lo que conduce a un procedimiento que consume tiempo. La reacción en cadena de la polimerasa utilizando muestras de lágrima, epitelio de la córnea, epitelio de la córnea, o botones cornéales pueden detectar ADN viral en casos de queratitis herpética o queratouveitis. Sin embargo, no distingue entre las infecciones por HSV activas o latentes. El diagnóstico es especialmente difícil en el caso de endotelitis disciforme o enfermedad estromal, como las partículas del virus por lo general no se encuentran en muestras de biopsias estromales y por lo tanto se pueden obtener sin cultivo.

En cuanto al tratamiento se refiere, a pesar de la disponibilidad de antivirales para terapia, esta enfermedad sigue siendo un problema significante. En Europa, el ungüento "Zovirax" (aciclovir) se aprueba para tratar infecciones oculares (aunque la aparición de cepas resistentes al fármaco es motivo de preocupación). El daño de la córnea no se impide por el aciclovir. En los Estados Unidos, "Viroptic" (solución acuosa de trifluorotimidina al 1%) es el único

fármaco aprobado para estas infecciones. Tanto el aciclovir como la trifluorotimidina han reducido la eficacia contra la enfermedad recurrente, que es la causa usual de la turbidez de la córnea que conduce a la ceguera. Efectos secundarios significantes pueden ocurrir con el uso de ambas preparaciones y debido a las formulaciones, existen problemas con la conformidad del paciente. Es evidente, que se necesitan estrategias de diagnóstico o terapéuticas mejoradas para enfermedades oculares por HSV.

Los anticuerpos se utilizan cada vez en diagnósticos y terapéuticos de varias enfermedades. El uso de anticuerpos sería extremadamente ventajoso en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades tales como aquellas descritas anteriormente donde el tratamiento alternativo es altamente insatisfactorio.

Los anticuerpos se pueden administrar sistémicamente, aunque pueden causar serios efectos secundarios sistémicos cuando las concentraciones terapéuticas se alcanzan en el sitio de infección.

La administración tópica de los anticuerpos para modular las condiciones inmunopatológicas de la córnea o segmento anterior, sería ventajosa para evitar estos efectos secundarios, pero no es efectiva ya que los anticuerpos completos son muy grandes para penetrar rápidamente la córnea (Allansmith M, de Ramus A, Maurice D. The dynamics of IgG in the cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci 1979; 18:947-55).

Es un objeto de la presente invención proveer el uso de un fragmento de enlace completamente humano del antígeno de un anticuerpo que tiene una secuencia con al menos 90 % de homología con SEQ ID NO:3 y/o SEQ ID NO:4 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad ocular por administración tópica.

Es otro objeto de la presente invención proveer el uso de un fragmento de enlace completamente humano del antígeno de un anticuerpo que tiene una secuencia con al menos 90 % de homología con SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad ocular por administración tópica.

Es otro objeto de la presente invención proveer una composición farmacéutica para la administración tópica ocular para el tratamiento y/o el diagnóstico de una enfermedad ocular que comprende un fragmento de enlace completamente humano de un anticuerpo, **caracterizado porque** dicho fragmento de enlace completamente humano del antígeno tiene una secuencia con al menos 90 % de homología con SEQ ID NO:3 y/o SEQ ID NO:4 o una secuencia con al menos 90 % de homología con SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2.

En particular, el anticuerpo neutraliza HSV1 y HSV2.

Definiciones

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la cual esta invención pertenece. Aunque muchos métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en este documento se pueden utilizar en la práctica o prueba de la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describen a continuación. A menos que se mencione de otra manera, las técnicas descritas en este documento para utilizar con la invención son metodologías estándar bien conocidas por los expertos de la técnica.

Mediante el término "Fab" o "fragmento de enlace del antígeno" se entiende cualquier fragmento de anticuerpo que retiene la capacidad de unirse a su antígeno e incluye al menos un dominio variable de ya sea la cadena liviana o la cadena pesada.

Por el término "enfermedad ocular" se entiende cualquier infección (primaria o secundaria), tal como por ejemplo queratitis ocular (epitelial y estromal), blefaritis, conjuntivitis, blefaroconjuntivitis, ulceraciones.

Por el término "potenciador de retención" se entiende cualquier sustancia o composición que prolongará el tiempo de residencia del producto en los compartimiento del ojo afectado por la enfermedad, tal como hialuronato de sodio, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxietilmetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, vinilpolialcohol, goma xantana, goma gellan, quitosano, ácido poliláctico y derivados de estos.

Por el término "composición farmacéutica" se entiende cualquier mezcla o combinación terapéuticamente aceptable de sustancias.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 muestra un ejemplo de una serie de imágenes de inmunohistoquímica que muestran el análisis de la córnea (a-h, l-n) y el cuerpo ciliar (i-k, o-q) 1 hora después de 5 instilaciones durante 4 días, luego 1 instilación única de AC-8 (a-k) en el último día o 1 hora después de 5 instilaciones durante 4 días, a continuación 1 instilación única de PBS en el último día (vehículo, l-q). d y h son aumentos superiores de los cuadrados blancos relacionados que muestran respectivamente (d) una célula sub-epitelial dendritiforme marcada con alexa y (h) el endotelio corneal marcado. Bars = 100 µm.

Figura 2 muestra imágenes de inmunohistoquímica de la córnea central (a-d) y periférica (e-j), 24 horas después de 5 instilaciones de AC-8, demostrando la penetración del Fab a través de una ruta transcleral. Figura 2 a: el cuadrado blanco muestra el área re-epitelializada de la úlcera previa. Figura 2d y 2i son respectivamente mayores aumentos de los cuadrados blancos en la figura 2c y 2h: las células estromales sub-epitelial se marcan positivamente para AC-8. Figura 2g y 2j son aumentos superiores de los cuadrados blancos en 2f y 2h respectivamente, mostrando el endotelio marcado positivamente AC-8.

Figura 2 k-m son los análisis IHC de una córnea tratada con vehículo control. Epit = epitelio, Endot = endotelio. Bar = 200 µm.

Figura 3 es un diagrama que muestra el efecto de AC-8 en los títulos de película de lágrimas después de infección viral ocular en el ratón y por lo tanto demostrando la neutralización de HSV mediante AC-8 in vivo como una función de tiempo.

Figura 4 es un histograma que muestra la concentración de AC-8 en humores acuosos y vítreos de ratones con córneas normales 1 y 6 horas después de 5 instilaciones de 5 µg de AC-8.

Figura 5 es un histograma que muestra la concentración de AC-8 en humores acuosos y vítreos de ratones con córneas des-epitelializadas 1 y 24 horas después de 5 instilaciones de 5 µg de AC-8.

Figura 6 es un diagrama que muestra la neutralización de HSV-1 en un ensayo de reducción de placa como una función de concentraciones crecientes de scFv AC-8.

Descripción Detallada de la invención

De acuerdo con la presente invención un fragmento de enlace completamente humano del antígeno de un anticuerpo que tiene una secuencia SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 se utiliza para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad ocular por administración tópica.

Se debe entender que las regiones constantes de respectivamente la cadena pesada (SEQ ID NO:1) y la cadena liviana (SEQ ID NO:2) se pueden reemplazar con cualquier región constante de inmunoglobulina humana apropiada de tal manera que la molécula final retiene la capacidad de unirse con el antígeno.

De esta manera en una modalidad alternativa de acuerdo con la presente invención el scFv con SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4 se puede utilizar para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad ocular por administración tópica.

En particular, el anticuerpo de la invención neutraliza HSV1 y HSV2. En particular, el antígeno de superficie viral es gD.

El medicamento de la invención preferiblemente se formula con un potenciador de retención del fragmento de enlace del antígeno en el ojo. Los potenciadores de retención útiles en la invención se pueden escoger del grupo que consiste de hialuronato de sodio, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxietilmetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilalcohol, goma xantana, goma gellan, quitosano, ácido poliláctico y derivados de estos.

El medicamento de la presente invención está preferiblemente en la forma de un colirio, ungüento, gel, crema oftálmica.

La enfermedad ocular ventajosamente es queratitis ocular, blefaritis, conjuntivitis, blefaroconjuntivitis, ulceraciones.

Los fragmentos de enlace de antígeno completamente humanos de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar en métodos de diagnóstico que comprenden el contacto de una porción de los ojos con los fragmentos de enlace de antígeno indicativos de la condición y detección de la presencia de un complejo que comprende el

fragmento de enlace del antígeno y el antígeno. La detection del complejo se puede realizar de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica, tal como el fragmento de enlace del antígeno que tiene un marcador detectable asociado con este, que posteriormente puede ser detectado en inmunoensayos in vitro e in vivo. Ejemplos de métodos in vitro son el ensayo inmunoabsorbente de Enzima ligada ELISA (indirecto, sandwich, competitivo) y radioinmunoensayo (RIA).

El marcador se puede asociar directa o indirectamente con el fragmento de enlace del antígeno, o unir a un posterior producto de reacción de la molécula de enlace del antígeno. El marcador se puede seleccionar del grupo que incluye un cromógeno, un catalizador, una enzima, un fluorocromo, una molécula quimioluminiscente, un radioisótopo y un colorante.

De acuerdo con la presente invención, se provee una composición farmacéutica para la administración tópica ocular para el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad ocular que comprende un fragmento de enlace completamente humano de un anticuerpo que incluye SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4.

Por ejemplo una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede consistir de 15% de H_2O, 15 % de aceite mineral de color blanco, 70 % de Aquaphor® (ungüento) y el fragmento Fab de la presente invención 1 mg/ml.

Los fragmentos de enlace de antígeno de la invención se pueden obtener mediante diferentes métodos conocidos en la técnica, por ejemplo mediante la digestión enzimática con papaína de IgGs extraídos o mediante la producción recombinante en sistemas de expresión eucariotas o procariotas (transitorios o estables) y la posterior purificación por afinidad.

Una principal ventaja de las composiciones de acuerdo con la invención resulta de los Fabs que son completamente humanos, i.e. que son codificados por una secuencia de polinucleótido humano. El uso in vivo de los Fabs de la invención para el diagnóstico o el tratamiento de enfermedades por HSV reduce en gran medida los efectos adversos debido a la respuesta inmune del huésped a los anticuerpos administrados de forma pasiva, lo que es un problema significante cuando se utilizan los anticuerpos monoclonales de derivación xenogénica o quimérica.

Adicionalmente, los fragmentos Fab son ventajosos con respecto a los IgGs totales, debido a que no se afectan por los receptores Fc en las células y no precipitan antígeno, por lo tanto muestran una inmunogenicidad reducida y son menos susceptibles a la fagocitosis. Por otra parte, los fragmentos Fab se eliminan más rápidamente del tejido que las moléculas de IgG completas.

Los Fabs también son más fáciles de producir en relación con los anticuerpos IgG en términos de proceso, costos y tiempo como se pueden producir en sistemas de expresión de E. coli.

Los Fabs son estables y solubles (insolubilidad que es una característica que puede potenciar la inmunogenicidad). Estas características permiten obtener altos niveles de expresión y una estabilidad óptima de la sustancia farmacéutica y el producto farmacéutico. La estabilidad de Fabs le permite mostrar una vida media larga.

De acuerdo con una modalidad alternativa de la presente invención también se proveen Fvs de cadena larga (scFv).

Como se muestra en la Figura 6 scFv AC-8 es altamente eficiente en la neutralización de la inefectividad por HSV en una prueba de reducción de placa in-vitro.

Los títulos virales medidos en muestras de película de lágrimas de ratones tratados con AC-8 mostraron neutralización efectiva de HSV1 en comparación con un Fab aespecífico.

Después de la instilación tópica, AC-8 penetra en el ojo intacto y se puede detectar utilizando ambas pruebas de inmunohistoquímica y Elisa a una hora después de la instilación, en el humor acuoso y en el vítreo. Después de la des-epitelialización de la córnea, la penetración ocular se potencia en el humor acuoso y en el vítreo. AC-8 se puede visualizar en las células de la córnea de córneas intactas y parece penetrar en los ojos sobre todo a través de una ruta transcleral. Después de la inyección subconjuntival, la penetración ocular de AC-8 es similar a la obtenida después de la instilación en una córnea des-epitelializada. Sin embargo, la inyección subconjuntival en los ojos después de la des-epitelialización de la córnea resulta en un aumento de 5 veces en la penetración ocular de AC-8. La inmunohistoquímica reveló que AC-8 pareció acumularse en las células sub-epiteliales dendríticas, demostrando su penetración de la córnea. Después de la instilación tópica, AC-8 se midió a concentraciones antivirales eficientes en el medio ocular.

Ejemplos

Ejemplo 1

Los títulos virales medidos en muestras de película de lágrimas de ratones tratados con AC-8 mostraron neutralización efectiva de HSV1 en comparación con un Fab aespecífico

Se administraron tratamientos de 3 µl cada uno por vía directa al ojo infectado (derecho). Los tratamientos (1 mg/mL de AC-8 o fragmento Fab específico) iniciaron a las 8:00am, 10:00am, 12:00pm, 2:00pm, 4:00pm, 6:00pm, 8:00pm, 10:00pm empezando en la mañana después de la infección (día 2) y continuaron durante 7 días. El tratamiento de los grupos siguió en el mismo orden uno cada día y se completaron dentro de una hora del tiempo inicial. Los ratones se anestesiaron con Isofluorano (3-5%) o el equivalente para cada tratamiento.

Cepa del Virus. Se utilizó el aislado ocular CJ394, que causa niveles moderados de queratitis con poca o ninguna mortalidad. Los animales se infectaron en el ojo derecho con 1×10^5 PFU.

Protocolo de infección. Para la infección, se anestesiaron los ratones BALB/C con quetamina/xilazina. La córnea derecha fue escarificada cerca del borde del limbo dejando la córnea central intacta. Una gota de 5 µl de DMEM que contiene el inoculo se colocó sobre la córnea derecha y los párpados de los ojos se cerraron 2 veces sobre la córnea y los animales se regresaron a sus jaulas.

Títulos virales. Las muestras de película de lágrimas para titular el virus en el ojo derecho, se recolectaron en los Días 1, 3, 5, 7, 9, 11, y 13 después de la infección. Los ratones se anestesiaron brevemente para la recolección de la muestra y se regresan a su jaula. Las muestras se recolectaron antes del inicio del tratamiento en cada uno de los días colocando 10 µl de medio de cultivo celular en la córnea, lavando el líquido 2-3 veces con una pipeta pipetman y transfiriendo luego el líquido a 190 µl de medio para el transporte al laboratorio de virología. Las muestras luego se diluyeron en serie y se titularon sobre monocapas de células Vero. Para la recolección de muestras de película de lágrimas, los ratones se anestesiaron con Isofluorano o el equivalente (3-5%).

Los resultados se muestran en la Figura 3.

Ejemplo 2

AC-8 penetra en el ojo intacto y se puede detectar por inmunohistoquímica una hora después de la instilación en el humor acuoso y en el vítreo

Este conjunto de experimentos se llevó a cabo para evaluar la penetración del fragmento Fab AC-8 administrado vía tópica. En particular, este experimento se llevó a cabo para evaluar la biodistribución de Fab cuando se administra vía tópica en córneas normales de ratas.

La sustancia probada fue el fragmento Fab a una concentración de 10 µg/mL en PBS. La ruta de administración fue por instilación o inyección subconjuntival en ambos ojos. El volumen de administración fue

- 50 µL por instilación utilizando el vial cuentagotas suministrado,

- 50 µL para inyección subconjuntival utilizando una jeringa de insulina.

Los animales fueron ratas Lewis albinos (6-8 semanas, 120-150 g, Charles River). Los animales se mantuvieron en condiciones validadas y aprobadas por The ethical committee of the University of Paris V y el documento ARVO concerniente al uso de animales en oftalmología experimental. Las ratas se sacrificaron al final de los experimentos in-vivo, mediante una inyección letal de pentobarbital.

Para las administraciones, las ratas no se anestesiaron, pero se mantienen restringidas físicamente con suavidad por unos pocos segundos con el fin de mejorar el tiempo de contacto con la córnea. Se utilizaron 3 ratas por grupo (6 ojos). Los animales fueron administrados de la siguiente manera:

Grupos (n=3)	Código de Grupo	Sustancia adm.	Ruta de Administración	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Sacrificio
1	H1	AC-8 Fab	Instilación	1	-	-	-	-	Día 0: 1 hora después de instilación
2	H6	AC-8 Fab	Instilación	5(1/hora)	-	-	-	-	Día 0: 1 hora después de the 5th instilación
3	D4	AC-8 Fab	Instilación	5	5	5	5	1	Día 4 : 1 hora después de instilación
4	SCJ1	AC-8 Fab	Inyección subconjuntival	1	-	-	-	-	Día 0: 1 hora después de inyección
5	SCJ6	AC-8 Fab	Inyección subconjuntival	1	-	-	-	-	Día 0: 6 hora después de inyección
6	D4 PBS	Vehículo	Instilación	5	5	5	5	1	Día 4 : 1 hora después de instilación
7	SCJ PBS	Vehículo	Inyección subconjuntival	1	-	-	-	-	Día 0: 1 hora después de inyección

Nota 1: Grupo 2 se realizó para darse cuenta de una dosis de carga. Una gota por hora no es compatible con un régimen de tratamiento.

Nota 2: Grupo 3 se realizó sobre unas 5 veces por día de instilación durante el periodo despierto, que corresponde a un régimen terapéutico.

El muestreo se resume en la siguiente tabla:

Grupos 1 a 7	$1P^{stP}$ Rata	$2P^{ndP}$ Rata	$3P^{rdP}$ Rata	Total de muestras	Análisis
Humor acuoso	2 ojos tratados	2 ojos tratados		28	Elisa
Humor vítreo	2 ojos tratados	2 ojos tratados		28	Elisa
Córneas	2 ojos tratados	2 ojos tratados		28	IHC
Ojo completo			2 ojos tratados	14	IHC
Suero (grupos 4, 5, 7)	1 - 2 mL	1-2mL	1-2mL	9	Elisa

Dos ratas (4 ojos) de cada grupo (1 a 7) se utilizaron para diseccionar las córneas para el montaje plano en laminillas portaobjetos. Los ojos se diseccionaron sobre hielo. Un total de 28 córneas se diseccionaron, y se montaron planas en placas de 24-pozos almacenadas a - 80°C.

Ambos ojos de la tercera rata de cada grupo (1 a 7, total 14 muestras) se colocaron en OCT (compuesto de Temperatura de Corte Óptima, Tissue-Tek) a -80°C. Todos los ojos derechos se utilizaron para criosección, y todos los ojos izquierdos se almacenaron a -80°C para su uso posterior si es necesario.

Las criosecciones se utilizaron para análisis inmunohistoquímicos (IHC) con anticuerpos marcados con el fin de determinar la distribución de Fab AC-8 dentro de las capas de la córnea y el globo ocular.

Las criosecciones congeladas (10 µm) se trataron de la siguiente manera:

- se fijaron 15 minutos en paraformaldehido 4% a RT,

- se aclararon dos veces 10 minutos en PBS 1X a RT,

- se aclararon 2 x 10 minutos en PBS-Triton X-100 0.1% a RT,

- se incubaron durante la noche a +4°C con IgG anti-humano de cabra (Pierce # 31132, 1/50 en PBS-Triton X-100 0.1%) excepto para el control incubado en PBS 1X solo,

- se aclararon 3 x 10 minutos en PBS-Triton X100 0.1% a RT,

- se incubaron 1 hora a +20°C en la oscuridad con Sondas Moleculares IgG anti-cabra de burro (H+L) - Alexafluor 594 (rojo) 1/50,

- se aclararon dos veces 10 minutos en PBS 1X a RT,

- se incubaron en DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol) (azul) 1/5000 en PBS 1X, para marcación nuclear, 5 minutos en la oscuridad a RT,

- se aclararon 5 x 5 minutos en PBS 1X a RT,

- se aclararon una vez 10 minutos en agua destilada a RT y se seca,

- se colocaron sobre láminas para el microscopio para lectura utilizando un Microscopio de Fluorescencia (Olympus).

Con el fin de tener localización confocal de AC-8 sobre las córneas, también se realizó IHC sobre las córneas montadas planas. La optimización del protocolo IHC se llevó a cabo en 1/4 de las córneas. La sensibilidad de la técnica no podría ser optimizada suficientemente con el material disponible, para conseguir la imagen confocal bien definida. Estos resultados no podrían ser interpretados exactamente. Esta es la razón porque las secciones de los ojos completas se escogieron para determinar la penetración de AC-8.

Los núcleos se tiñeron con azul con DAPI, y los anticuerpos IgG antihumanos, utilizados para revelar AC-8, aparecen en rojo (anticuerpo secundario Alexa flúor 594-marcado).

Grupo 1 "H1" (Día 0: 1 instilación de AC-8 10 µg/ml, sacrificio 1 hora después).

Ninguna diferencia en la fluorescencia se muestra entre los ojos tratados con AC-8 (grupo 1) y los ojos control PBS (grupo 6) demostrando que una hora después una instilación única de 10 µg/ml de AC-8, no se observa penetración de AC-8 en tejidos oculares.

Grupo 2 "H6" (Día 0: 5 instilaciones de AC-8, 10 µg/ml, sacrificio 1 hora después).

Cuando AC-8 se instila cada hora, durante 5 horas y el sacrificio se realiza una hora después de la última instilación, AC-8 se detecta en la periferia de la córnea como puntos que podrían corresponder a inmersión de AC-8 en células dendríticas, que se localizan en el estroma sub-epitelial. En el centro de la córnea, la tinción también se observa en el estroma como una señal difusa así como parches. En el cuerpo ciliar y la retina, una tinción difusa pero suave se puede detectar cuando se compara con las ratas tratadas con PBS (grupo 6).

Grupo 3 "D4" (Día 0 a Día 3:5 instilaciones por día de AC-8, 10 µg/ml, Día 4: 1 instilación, sacrificio 1 hora después).

La inmunohistoquímica en la córnea después del tratamiento con AC-8, 5 veces al día durante 4 días y una vez en el quinto día. Los resultados se compararon con el grupo vehículo 6. Cuando AC-8 se instila 5 veces al día durante 4 días, a una concentración de 10 µg/ml (Figura 1, a-k), se observa una penetración intensa de AC-8 en la periferia de la córnea (Figura 1 e-h), así como en el estroma anterior en el centro de la córnea (Figura 1 a-d). La penetración de AC-8 es mucho más alta en la periferia de la córnea, el limbo y en el cuerpo ciliar que en el centro de la córnea, lo que sugiere que AC-8 penetra en el ojo a través de una ruta transescleral, y luego se difunde en la córnea. De nuevo aquí, las células dendríticas parecen tener AC-8 envuelto dado que las células dendritiformes se tiñen positivamente con AC-8 se localizan en el estroma sub-epitelial (Figura 1d). En la retina, AC-8 se localiza en los astrocitos en el borde retinal interior.

Grupo 4 "SCJI" (Día 0: 1 inyección subconjuntival de AC-8, 10 µglml, sacrificio 1 hora después).

Una sola inyección subconjuntival de AC-8 resulta en una tinción muy fuerte de AC-8 en ambos el segmento anterior y el segmento posterior del ojo. Los resultados se compararon con el grupo vehículo 7. En la córnea, AC-8 se concentra en el epitelio y en el estroma como una tinción difusa así como se localiza en las células de la córnea.

En el cuerpo ciliar, AC-8 parece haber penetrado y se acumula en las células epiteliales. En la retina, AC-8 se localiza claramente en las células gliales (astrocitos así como prolongaciones de la célula glial Müller). En las células epiteliales pigmentadas retinales (células RPE), una señal fuerte también se observa.

Grupo 5 "SCJ6" (Día 0: 1 inyección subconjuntival de AC-8, 10 µg/ml, sacrificio 6 horas después).

En la córnea, AC-8 parece que es en parte permanece esencialmente en el estroma. En el cuerpo ciliar, la señal fluorescente se reduce cuando se compara con el Grupo 4, pero el limbo se tiñe incluso en este punto de tiempo. En la retina, la señal AC-8 no está presente en las células gliales y los astrocitos nunca más. En las células epiteliales pigmentadas retinales (células RPE), la señal también se reduce. Los resultados se compararon con el grupo vehículo 7.

En estos experimentos el control interno que omite el primer anticuerpo, fueron negativos y mostraron una base no específica muy limitada, al contrario para los ojos tratados con PBS que mostraron alguna base no-específica.

El análisis de las muestras mediante la detección IHC sugiere que AC-8 se puede detectar utilizando protocolos específicos de inmunohistoquímica. Después de la instilación de 10 µg/ml de AC-8 sobre córneas normales, el anticuerpo:

- no se detecta en la córnea o en cualquiera de los tejidos del ojo, 1 hora después de la instilación única;

- se detecta en la córnea después de 5 instilaciones, una señal baja se observa en el cuerpo ciliar y ninguna señal se puede detectar en la retina;

- se localiza fuertemente en la córnea, el cuerpo ciliar y en la retina, cuando se instila 5 veces al día durante 4 días.

Cuando se observa la penetración de la córnea, dos tipos de la tinción se detectan: una tinción difusa localizada en el estroma y la otra tinción concentrada en sub-células epiteliales de la córnea (células dendríticas o queratocitos).

Dado que AC-8 se observa en células en el estroma sub-epitelial en córneas normales y en células en el espesor estromal completo en la córnea des-epitelializada (ver los siguientes ejemplos), es posible que AC-8 sea fagocitado en las células dendríticas.

Una hora después de una sola inyección subconjuntival de 10 µg/ml de AC-8, el anticuerpo se localiza no solo en la córnea si no también se observa en el cuerpo ciliar y en los astrocitos y células gliales de la retina. Utilizando esta ruta de administración, capas externas profundas de la retina (células Epiteliales del Pigmento Retinal) también se tiñen. La tinción es más fuerte en la periferia de la córnea que en el centro, como se observa después de la instilación. Seis horas después de una sola inyección subconjuntival de 10 µg/ml de AC-8, el anticuerpo casi se ha eliminado del ojo: permanece ligeramente en la córnea y el limbo pero no es detectable nunca más en el cuerpo ciliar ni en la retina.

En conclusión, estas observaciones sugieren que AC-8 puede penetrar dentro de los tejidos oculares del ojo a través de una córnea intacta o a través de su limbo adyacente, y esta penetración se puede observar en la concentración de 10 µg/ml.

AC-8 parece penetrar a través de una ruta transcleral en el limbo, explicando penetración retinal y tinción fuerte a la periferia de la córnea. AC-8 se envuelve en las células de la córnea que pueden corresponder a las células dendríticas o queratocitos. Sí AC-8 causa activación de la célula dendrítica permanece para ser clarificada.

Ejemplo 3

AC-8 penetra en el ojo intacto y se puede detectar utilizando una prueba de ELISA a una hora después de la instilación en el humor acuoso y en el vítreo

Sesenta (60) ratas pigmentadas de la cepa Brown Norway se dividieron aleatoriamente en diez (10) grupos de seis (6) animales.

Para la administración tópica (los grupos 1 a 8), los animales recibieron 10 µl de ítems de prueba o vehículos en ambos ojos 5 veces al día.

Para las administraciones sub-conjuntivales (grupos 9 y 10), los animales recibieron una sola inyección de 50 µl de ítem de prueba 1 en ambos ojos.

La tabla a continuación resume la asignación de los animales en grupo de tratamiento:

Grupo	***Ruta de administración***	***Tratamiento***	***Puntos de tiempo después de la última administración***	***Número de animales***
1	1 5 x instilación	Fab AC-8 (1 mg/ml)	1 h	6 con administración en ambos ojos
2			6 h	
3		Fab AC-8 (0.5 mg/ml en PBS)	1 h	
4			6 h	
5		Fab AC-8 (0.5 mg/ml en Vismed®)	1 h	
6			6 h	
7		PBS (vehículo 1)	1 h	
8		PBS/Vismed® (vehículo 2)	1 h	

(continuación)

Grupo	***Ruta de administración***	***Tratamiento***	***Puntos de tiempo después de la última administración***	***Número de animales***
9	1 x inyección subconjuntival	Fab AC-8 (1 mg/ml)	1 h	
10			6 h	

En los puntos de tiempo correspondientes, los animales se anestesiaron. La sangre completa se muestreo para preparación del suero. Después de la eutanasia, humor acuoso (AH), epitelio de la córnea (Cepi), estroma corneal + endotelio (Cstr+end), vítreo (V) y retina (R) se muestrearon de ambos ojos y se mezclaron para cada animal por análisis de ELISA

Ruta y Método de Administración. Para los grupos 1 a 8, el ítem de prueba o vehículos se instilaron 5 x 10 µl durante el día (8 am a 4:00 pm) en ambos ojos utilizando una micropipeta apropiada.

Para los grupos 9 a 10, los animales recibieron bajo anestesia (inyección i.m. de xilazina 5 mg/kg; quetamina 25 mg/kg) una sola inyección subconjuntival (50 µl) en ambos ojos.

En los puntos de tiempo enumerados en la anterior tabla, los animales se anestesiaron mediante una inyección intramuscular de una solución mezcla de Rompun® (xilazina 5 mg/kg) y Imalgene® 1000 (quetamia 25 mg/kg).

Aproximadamente 2 ml de sangre se retiraron mediante punción cardíaca justo antes del sacrificio. 600 µl del suero para cada animal fueron almacenados a -80°C, hasta el ensayo de Elisa.

Los animales fueron sometidos a eutanasia mediante una inyección cardíaca de sobredosis de pentobarbital.

Inmediatamente después del sacrificio, el humor acuoso (AH), el epitelio de la córnea (Cepi), el estroma corneal + endotelio (Cstr+end), vítreo (V) y retina (R) fueron rápida y cuidadosamente diseccionados de ambos ojos de 2 ratas. Las estructuras oculares de ambos ojos se mezclaron parar cada animal de cada grupo.

Los resultados de las concentraciones de Ac-8 en el humor acuoso y humor vítreo se muestran en la Figura 4.

Ejemplo 4

Después de la des-epitelialización de la córnea, la penetración ocular se potencia en el humor acuoso y en el vítreo

Este conjunto de experimentos se llevó a cabo para evaluar la biodistribución de Fab cuando se administra vía tópica en las córneas des-epitelializadas de rata y durante la fase de reepitelialización de las córneas. El experimento permitió la evaluación de la penetración de Fab en la córnea durante la cicatrización de una penetración de la úlcera de la córnea del fragmento Fab AC-8 administrado vía tópica.

La sustancia probada fue como se describe anteriormente, pero la concentración fue 100 µg/ml. Los animales fueron como se describe anteriormente. La instilación o inyección subconjuntival se llevó a cabo en un ojo en lugar de ambos ojos.

En el día 0, un ojo de cada animal fue des-epitelializado sobre un zona de la córnea calibrada, bajo anestesia general (xilazina + quetamia) y anestesia local, utilizando un punzón de biopsia calibrado y un cuchillo quirúrgico. Por razones éticas, el modelo de úlcera de córnea y el posterior tratamiento solo fueron realizados en un ojo por animal. Los ojos contralaterales se deben dejar sin tocar. Se utilizaron 5 ratas (5 ojos, solo ojos derechos) por grupo. Los animales se administraron de la siguiente manera:

Grupos (n=5)	Código de Grupo	Sustancia Adm.	Ruta de administración	Día 0	Día 1	Día 2	Sacrificio
1	H5	Fab AC-8	Instilación	5 (1 / hora)	-	-	Día 0: 1 hora después de la 5ª instilación
2	H29	Fab AC-8	Instilación	5 (1 / hora)	-	-	Día 1: 24 horas después de la 5ª instilación
3	D2	Fab AC-8	Instilación	5 (1 / hora)	5 (1 / hora)	1	Día 2: 1 hora después de la última instilación
4	SCJ1	Fab AC-8	Inyección subconjuntival	1	-	-	Día 0: 1 hora después de inyección
5	SCJ6	Fab AC-8	Inyección subconjuntival	1	-	-	Día 0: 6 horas después de inyección
6	SCJ24	Fab AC-8	Inyección subconjuntival	1	-	-	Día 1: 24 horas después de inyección
7	C-D2	Vehículo	Instilación	5 (1 / hora)	5 (1 / hora)	1	Día 2: 1 hora después de la última instilación
8	C-SCJ	Vehículo	Inyección subconjuntival	1	-	-	Día 0: 1 hora después de inyección

El muestreo se resume en la siguiente tabla:

Grupos 1 a 8	**Rata 1**	**Rata 2**	**Rata 3**	**Rata 4**	**Rata 5**	**Total de muestras**	**Análisis**
Humor acuoso	1 ojo tratado	1 ojo tratado	1 ojo tratado	1 ojo tratado	-	32	Elisa
Humor vítreo	1 ojo tratado	1 ojo tratado	1 ojo tratado	1 ojo tratado	-	32	Elisa
Córneas	1 ojo tratado	1 ojo tratado	1 ojo tratado	1 ojo tratado	-	32	Elisa
Retinas	1 ojo tratado	1 ojo tratado	1 ojo tratado	1 ojo tratado	-	32	Elisa
Ojo completo	-	-	-	-	1 ojo	8	IHC
Suero	1-2mL	1-2mL	1-2mL	1-2mL	1-2mL	40	Elisa

4 ratas (4 ojos tratados) de cada grupo (1 o 8) se utilizaron para recolectar humores acuosos y vítreos, suero y neuroretinas, para la prueba de ELISA. Muestras de suero (aproximadamente 1-2 mL) se tomaron de las 5 ratas de cada grupo 1 a 8, justo antes del sacrificio. Un total de 32 muestras de humor acuoso (aproximadamente 10 - 20 µL) y humor vítreo (aproximadamente 20 - 30 µL), 32 muestras de córneas y retinas y 40 muestras de suero se recolectaron en recipientes Eppendorf con tapa rosca y se almacenaron a -80°C.

Ambos ojos de la quinta rata de cada grupo (total 16 muestras) se fijaron y prepararon para criosección.

Las criosecciones se utilizaron para análisis inmunohistoquímico (IHC) con anticuerpos marcados, con el fin de determinar la distribución de Fab AC-8 dentro de las capas de la córnea y el globo ocular.

Las criosecciones congeladas (10 µm) se trataron de la siguiente manera :

- se fijaron 15 minutos en paraformaldehido 4% a temperatura ambiente (RT),

- se aclaran dos veces 10 minutos en PBS 1X a RT,

- **se** aclaran 2 x 10 minutos en PBS-Triton X-100 0.1% a RT,

- se incuban durante la noche a +4°C con IgG anti-humano de cabra (Pierce # 31132, 1/50 en PBS-Triton X-100 0.1%) excepto para el control incubado en PBS 1X solo,

- se aclaran 3 x 10 minutos en PBS-Triton X100 0.1% a RT,

- se incuban 1 hora a +20°C en la oscuridad con Sondas Moleculares IgG anti-cabra de burro (H+L) - Alexafluor 594 (rojo) 1/50,

- se aclaran dos veces 10 minutos en PBS 1X a RT,

- se incuban en DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol) (azul) 1/5000 en PBS 1X, para marcación nuclear, 5 minutos en la oscuridad a RT,

- se aclaran 5 x 5 minutos en PBS 1X a RT,

- se aclaran una vez 10 minutos en agua destilada a RT y se secan,

- se colocan sobre láminas para lectura en el microscopio utilizando un Microscopio de Fluorescencia (Olympus).

Los núcleos se tiñeron con azul con DAPI, y los anticuerpos IgG antihumanos, utilizados para revelar AC-8, aparecen en rojo (anticuerpo secundario Alexa flúor 594-marcado).

Grupo 1 "H5" (Día 0: 5 instilaciones de AC-8 100 µg/mL, sacrificio 1 hora después de la última).

AC-8 se detecta claramente en el centro (especialmente en la unión entre las zonas epitelilizadas - des-epitelializadas) y en la periferia de la córnea: AC-8 concentra en el espacio sub-epitelial en el borde de la ulceración. Curiosamente, también se observa la penetración de AC-8 en la periferia de la córnea, en el espacio sub-epitelial. En el endotelio de la córnea, AC-8 no se puede detectar en la zona central, pero es ligeramente detectable en la zona periférica. La inmunohistoquímica de la córnea tratada con PBS-control muestra muy poca base.

En el limbo AC-8 se localiza en el cuerpo ciliar y también en el iris. Tener en cuenta que AC-8 también se identifica en las células endoteliales vasculares en el limbo.

Esta distribución de AC-8 en una córnea des-epitelializada muestra que la penetración del Fab ocurre principalmente a través del limbo y una ruta transcleral, en lugar de a través de una trans-penetración directa de la córnea.

En el grupo 1, se observa una marcación muy débil de AC-8 en la retina.

Grupo 2 "H29" (Día 0: 5 instilaciones de AC-8 100 µg/ml, sacrificio 24 horas después).

En el Grupo 2, el epitelio de la córnea de la córnea central se reforma casi completamente en todas las secciones examinadas (Figura 2 a-j), con algunas irregularidades en la superficie del epitelio reconstituido (cuadrado blanco Figura 2 a). AC-8 permanece localizado en las células en el espacio sub-epitelial. En la periferia de la córnea (Figura

2 e-j), AC-8 se concentra en el epitelio, el espacio sub-epitelial (Figura 2i flechas) y se acumula en el endotelio (Figura 2g y 2j, puntas de flecha).

24 horas después de 5 instilaciones, AC-8 ha penetrado de la superficie de la córnea en la capa más profunda de la córnea y hasta el endotelio. También se observa claramente en el iris en este punto de tiempo (Figura 2f y 2h flechas). La infiltración de las células que contienen AC-8, se localizan en el espacio sub-epitelial de la córnea (Figura 2f y 2h, flechas, Figura 2c, gran ampliación, Figura 2i, flechas). Estas células podrían corresponder a células polimorfonucleares, macrófagos o a células dendríticas.

En el limbo y el cuerpo ciliar, AC-8 ha penetrado a través del epitelio y se localiza en la zona subepitelial y en el cuerpo ciliar.

En el grupo 2, AC-8 se detecta en la retina periférica pero no en la retina posterior central. Cuando se compara con el grupo control 7, AC-8 parece que se localiza en las capas nucleares de la retina periférica.

Grupo 3 "D2" (Día 0 a Día 1: 5 instilaciones por día de AC-8 100 µg/mL, Día 2: 1 instilación, sacrificio 1 hora después).

En el Grupo 3, el epitelio se reforma totalmente y la instilación ha sido continua durante el periodo de cicatrización. AC-8 se detecta muy fuertemente en las células epiteliales de la córnea, en células estromales y ampliamente en el endotelio cuando se compara con el grupo de vehículo control.

El examen del limbo en el grupo 3 y la retina anterior muestra que AC-8 ha penetrado profundamente en el cuerpo ciliar cuando se compara con el grupo de vehículo control. AC-8 se identifica en el epitelio del cuerpo ciliar.

En el grupo 3, una tinción significante para AC-8 se nota en la retina periférica pero no en la retina posterior (central). Curiosamente, AC-8 parece haberse difundido en todas las capas de la retina, así como en la capa celular RPE.

Cuando se compara con la penetración de AC-8 en la córnea intacta (ver anteriormente), parece que la ulceración del epitelio ha mejorado la penetración retinal de AC-8.

Grupo 4 "SCJI" (Día 0: 1 inyección de solución de AC-8, 100 µglml, sacrificio 1 hora después), Grupo 5 "SCJ6" (Día 0: 1 inyección de solución de AC-8, 100 µg/mL, sacrificio 6 horas después), Grupo 6 "SCJ24" (Día 0: 1 inyección de solución de AC-8, 100 µg/mL, sacrificio 24 horas después).

Una sola inyección de AC-8 en el espacio sub-conjuntival es eficiente para permitir la penetración de AC-8 en la periferia de la córnea a 1 hora, 6 horas y 24 horas.

La penetración de AC-8 después de la inyección subconjuntival es más fuerte en la periferia de la córnea que en el centro de la córnea, donde permanece débil en todos los puntos de tiempo incluso en las córneas ulceradas (Grupo 4 y Grupo 5). La reformación de la integridad del epitelio no influye la distribución de AC-8 en todas las capas de la córnea y en el iris a 24 horas (Grupo 6).

En el limbo y el cuerpo ciliar, AC-8 se distribuye homogéneamente como se observa en los grupos 4 y 5, con una concentración adicional de AC-8 en la región sub-epitelial del limbo en el grupo 6. La inyección sub-conjuntival también es eficiente para permitir la penetración de AC-8 en un ojo con una ulceración de la córnea, no solo en las capas de la retina, en la periferia de la retina sino también, pero más ampliamente, en la región posterior de la retina a 1 hora (grupo 4), 6 horas (grupo 5) y 24 horas (grupo 6). A 24 horas, AC-8 sobre todo se concentra en la periferia de la retina (grupo 6).

En la retina, AC-8 se detecta como concentración desigual de la tinción en células retinales, pero AC-8 no se distribuye homogéneamente en la retina total.

Las observaciones del ICH se resumen en la siguiente tabla:

	CORNEA						**CUERPO CILIAR/LIMBO**		**RETINA**	
	Central (zona ulcerada)			Periferia			Iris/cb	limbo	perip	post
	epit	estroma	endot	epit	estroma	endot				
Grupo 1 (5 inst, 1 h)	-	+++	-	-	+++	+/-	+++	+++	-	-
Grupo 2 (5 inst, 24 h)	-	+	-	++	++	+	-	+	+/-	-
Grupo 3 (5 inst, 5 inst, 1 inst, 1 h)	++	+	-	++	+++	-	++	++	+	-
Grupo 4 (1 sub-conj, 1 h)	-	-/+	-	+	+	+/-	++	++	+	+/-
Grupo 5 (1 sub-conj, 6 h)	+/-	-	-	++	+++	++	++	++	+	+/-
Grupo 6 (1 sub-conj, 24 h)	-	-	-	+/-	++	-	+++	+++	+	+/-
Grupo 7 - Control (5 inst, 5 inst, 1 inst, 1 h)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 8 - Control (1 sub-conj, 1 h)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Control sin anticuerpo primario	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Durante el proceso de re-epitelialización, la instilación de AC-8 no retrasa la cicatrización de la córnea, cuando se compara con el control y no mejora significantemente ninguna reacción inflamatoria histológica o clínica.

La penetración de AC-8 en la córnea (epitelio, estroma y endotelio) se observa principalmente en la periferia de la córnea y en el limbo. AC-8 se detecta en las células de la córnea (células endoteliales y epiteliales así como células estromales) y también se observa en las células sub-epiteliales infiltrantes que podrían resultar de una reacción inmunológica local a la inyección de AC-8 (AC-8 que se reconoce como un extranjera - humana - proteína).

AC-8 penetra también en el iris, cuerpo ciliar y retina periférica en el último punto de tiempo, lo que sugiere difusión de los tejidos exterior al interior del ojo. Es interesante notar que AC-8 también se observa en el endotelio vascular de las células endoteliales, lo que implica que podría ocurrir una difusión sistémica de AC-8 potencialmente.

La localización de AC-8 en las diferentes regiones de la córnea claramente muestra que la penetración de AC-8 ocurre sobre todo a través de una ruta transcleral, incluso cuando una úlcera está presente en el centro del epitelio.

La instilación de AC-8 debería ser capaz de penetrar la córnea en todas las etapas de herpes queratitis, incluso cuando se reforma el epitelio de la córnea.

La inyección sub-conjuntival es tan eficiente como las instilaciones repetidas de AC-8 para orientar la córnea.

La penetración de AC-8 en la córnea parece seguir la misma ruta transcleral utilizando ya sea instilación o inyección subconjuntival.

La inyección sub-conjuntival es más eficiente que las instilaciones repetidas para dirigir para orientar el cuerpo ciliar y la retina.

Los resultados de ELISA obtenidos en humor acuoso y humor vítreo de córnea des-epitelializada, se resumen en la Figura 5. Como se puede notar de la figura, la cuantificación de AC-8 en ambos humores acuosos y vítreos demuestra una penetración eficiente en el ojo.

En conclusión, del presente estudio de distribución realizado en la córnea ulcerada, parece que 5 instilaciones por día no son tóxicas en la córnea des-epitelializada.

Después de 5 instilaciones por día, AC-8 permanece localizado en células de la córnea durante 24 horas, y penetra en las capas de la córnea profundas así como en el iris y el cuerpo ciliar.

La penetración de AC-8, sobre todo se observa a través del limbo y una ruta transcleral, lo que sugiere que AC-8 será capaz de penetrar la córnea en todas las etapas del herpes queratitis, incluso cuando el epitelio se reforma.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Ribovax biotechnologies s.a.

<120> FRAGMENTOS DE ENLACE DE ANTÍGENO DE UN ANTICUERPO PARA UTILIZAR EN EL TRATAMIENTO Y DIAGNÓSTICO ENFERMEDADES OCULARES

<130> 209-09

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 231

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1               5                  10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Ser Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Gly Leu Met Pro Ile Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Asp Arg Leu Thr Ile Thr Ala Asp Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Tyr Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Val Ala Tyr Met Leu Glu Pro Thr Val Thr Ala Gly Gly Leu
            100                 105                 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
        115                 120                 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145                 150                 155                 160

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

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
            180                 185                 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
        195                 200                 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
    210                 215                 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
225                 230
```

<210> 2

<211> 214

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala
            20                  25                  30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
        35                  40                  45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65                  70                  75                  80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 3

<211> 125

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 3

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1               5                   10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Ser Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Gly Leu Met Pro Ile Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Asp Arg Leu Thr Ile Thr Ala Asp Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Tyr Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Val Ala Tyr Met Leu Glu Pro Thr Val Thr Ala Gly Gly Leu
            100                 105                 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 4

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala
            20                  25                  30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
        35                  40                  45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65                  70                  75                  80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

REIVINDICACIONES

1. Un fragmento de enlace del antígeno HSV completamente humano de un anticuerpo que incluye una secuencia con 90 % de homología con la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4 para utilizar en el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad ocular por administración tópica.

2. Un fragmento de enlace del antígeno HSV completamente humano de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4 para utilizar en el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad ocular por administración tópica.

3. Un fragmento de enlace del antígeno HSV completamente humano de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, incluyendo una secuencia con 90 % de homología con SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4 para utilizar en el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad ocular por administración tópica.

4. Un fragmento de enlace del antígeno HSV completamente humano de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3, que consiste de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO:4 para utilizar en el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad ocular por administración tópica.

5. Un fragmento de enlace del antígeno HSV completamente humano de un anticuerpo que incluye una secuencia con 90 % de homología con SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 para utilizar en el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad ocular por administración tópica.

6. Un fragmento de enlace del antígeno HSV completamente humano de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5, que consiste de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO:2 para utilizar en el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad ocular por administración tópica.

7. El fragmento de enlace del antígeno HSV completamente humano de un anticuerpo para utilizar en el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad ocular por administración tópica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** dicho anticuerpo neutraliza HSV1 y HSV2.

8. El fragmento de enlace del antígeno HSV completamente humano de un anticuerpo para utilizar en el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad ocular por administración tópica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el antígeno de superficie viral es gD.

9. El fragmento de enlace del antígeno HSV completamente humano de un anticuerpo para utilizar en el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad ocular por administración tópica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el medicamento se formula con un potenciador de retención del fragmento de enlace del antígeno en el ojo.

10. El fragmento de enlace del antígeno HSV completamente humano de un anticuerpo, para utilizar en el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad ocular por administración tópica de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado porque** el potenciador de retención se elige en el grupo que consiste de hialuronato de sodio, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxietilmetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, vinilpolialcohol, goma xantana, goma gellan, quitosano, ácido poliláctico y los derivados de estos.

11. El fragmento de enlace del antígeno HSV completamente humano de un anticuerpo para utilizar en el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad ocular por administración tópica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el medicamento es en la forma de un colirio, ungüento, gel, crema oftálmica.

12. El fragmento de enlace del antígeno HSV completamente humano de un anticuerpo para utilizar en el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad ocular por administración tópica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la enfermedad ocular es queratitis ocular, blefaritis, conjuntivitis, blefaroconjuntivitis, ulceraciones.

13. El fragmento de enlace del antígeno HSV completamente humano de un anticuerpo para utilizar en el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad ocular por administración tópica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el fragmento de enlace completamente humano tiene un marcador detectable asociado con este.

14. Una composición farmacéutica para la administración tópica ocular, para utilizar en el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad ocular por administración tópica para utilizar en el tratamiento o el diagnóstico de una enfermedad ocular que comprende un fragmento de enlace HSV completamente humano de un anticuerpo para

utilizar en el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad ocular por administración tópica, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

FIG. 1a

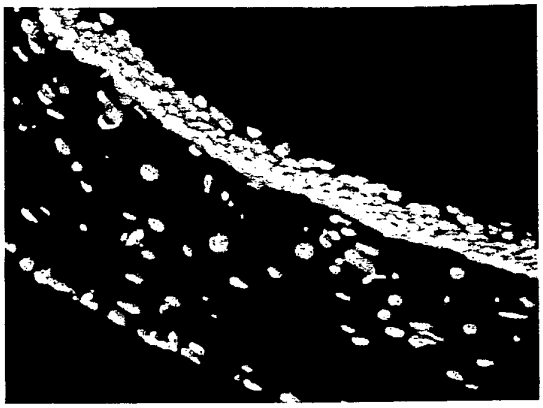


FIG. 1b

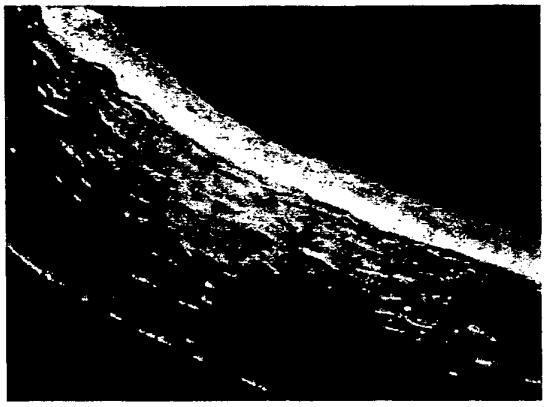


FIG. 1c

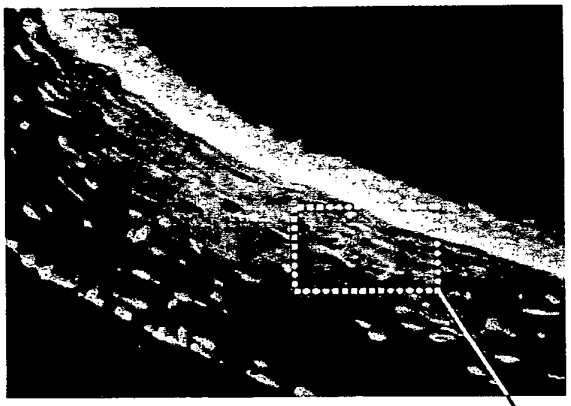


FIG. 1d

FIG. 1e

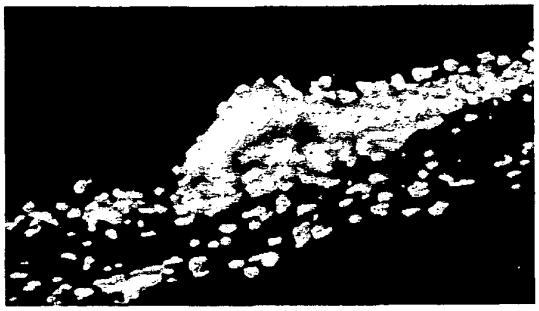


FIG. 1f

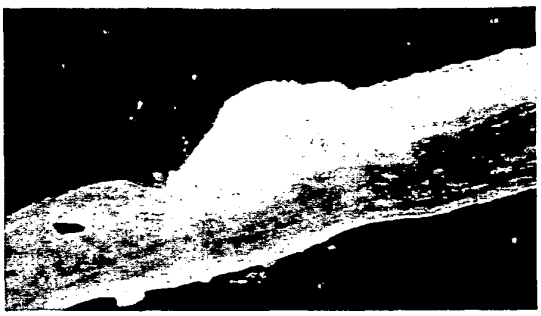


FIG. 1g

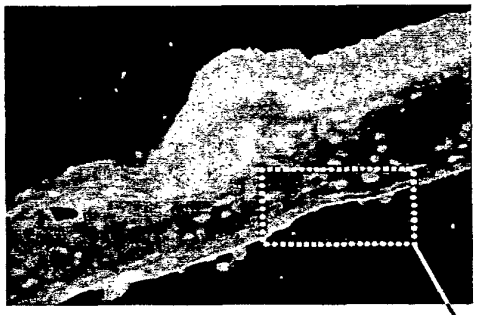


FIG. 1h

FIG. 1 i

FIG. 1j

FIG. 1k

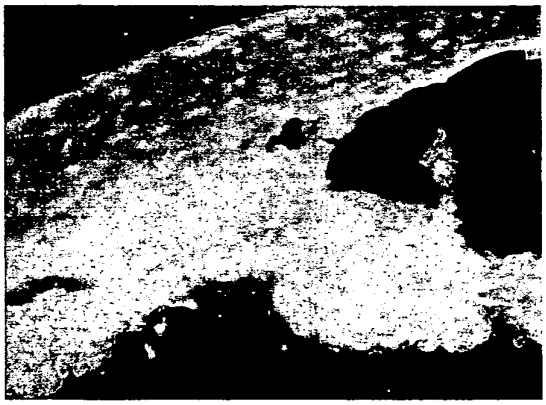


FIG. 1l

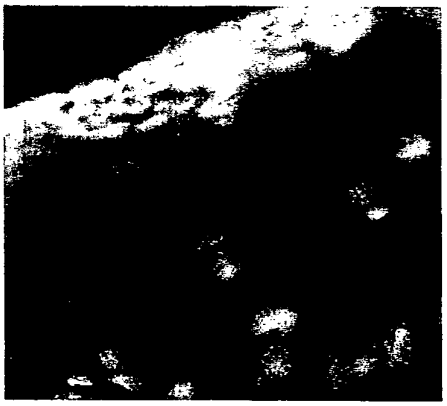


FIG. 1m

FIG. 1n

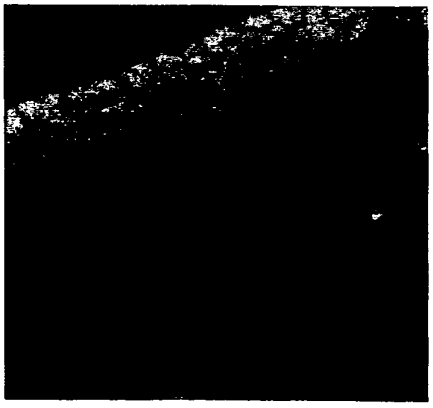


FIG. 1 o

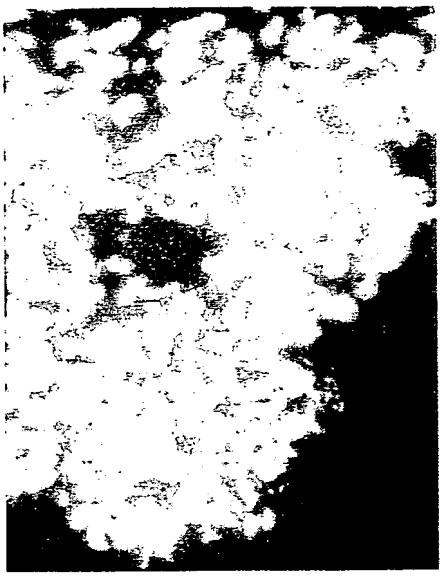


FIG. 1p

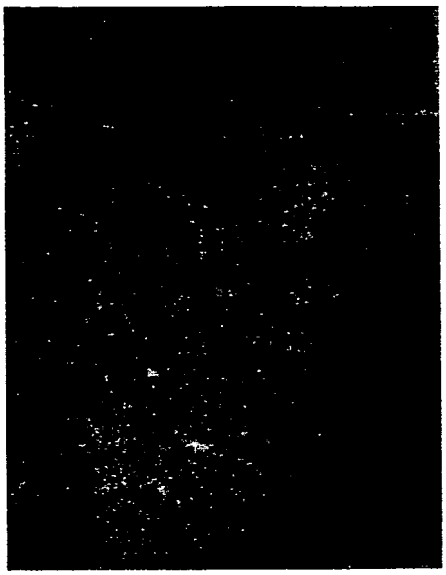


FIG. 1q

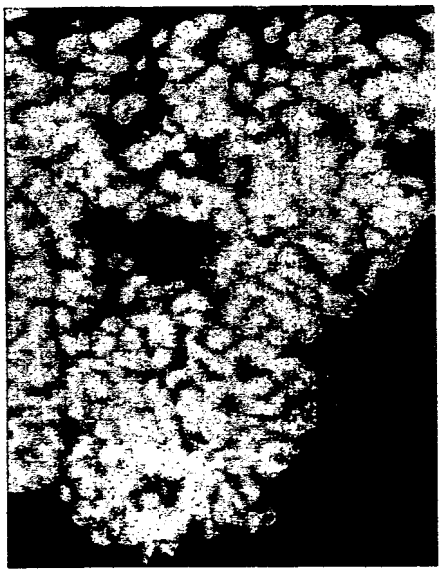


FIG. 2a

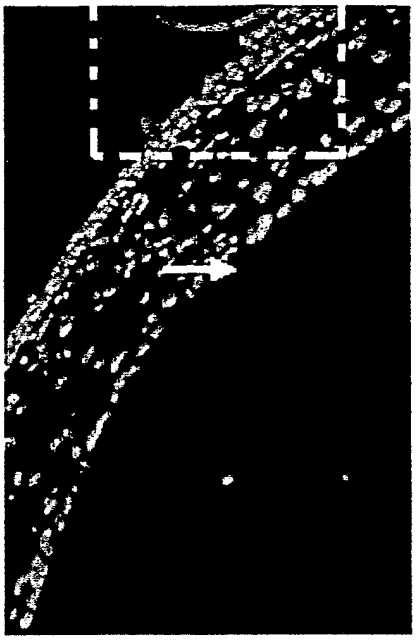


FIG. 2b

FIG. 2c

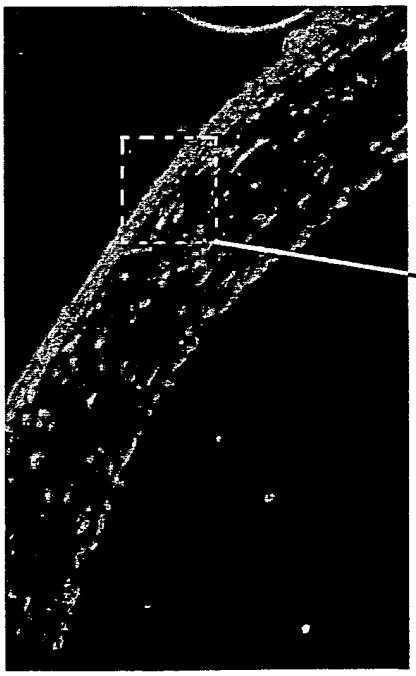


FIG. 2d

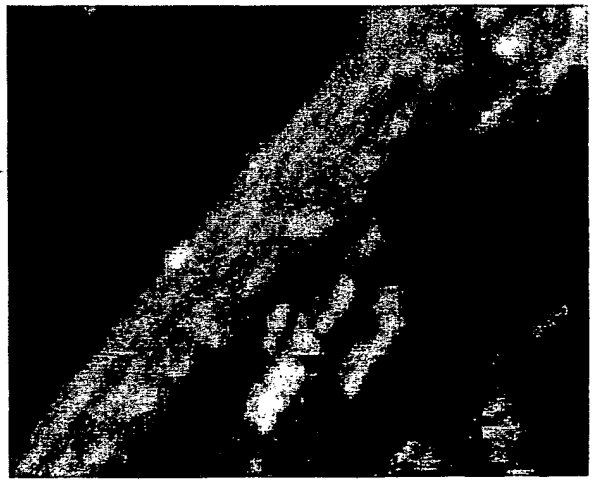


FIG. 2e

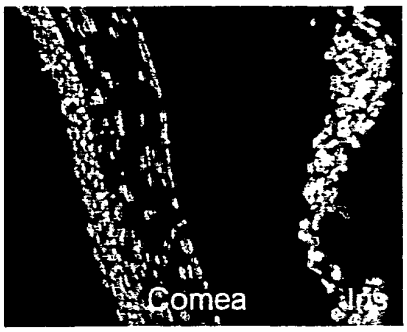


FIG. 2f

FIG. 2g

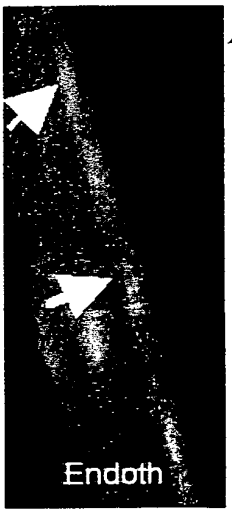


FIG. 2h

FIG. 2i

FIG. 2j

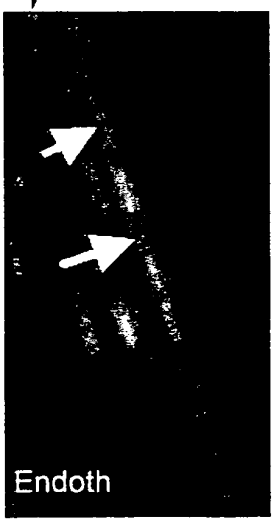


FIG. 2k

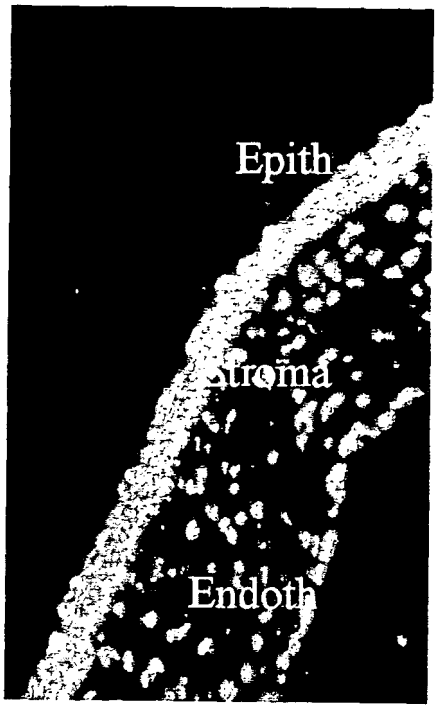


FIG. 2l

FIG. 2m

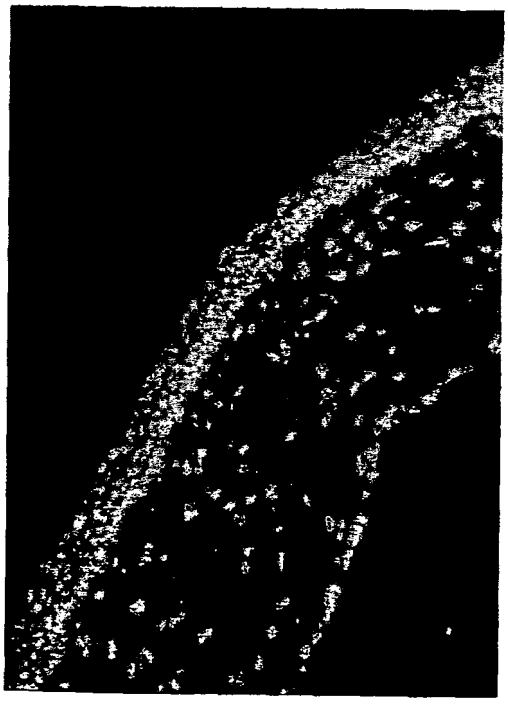


FIG. 3

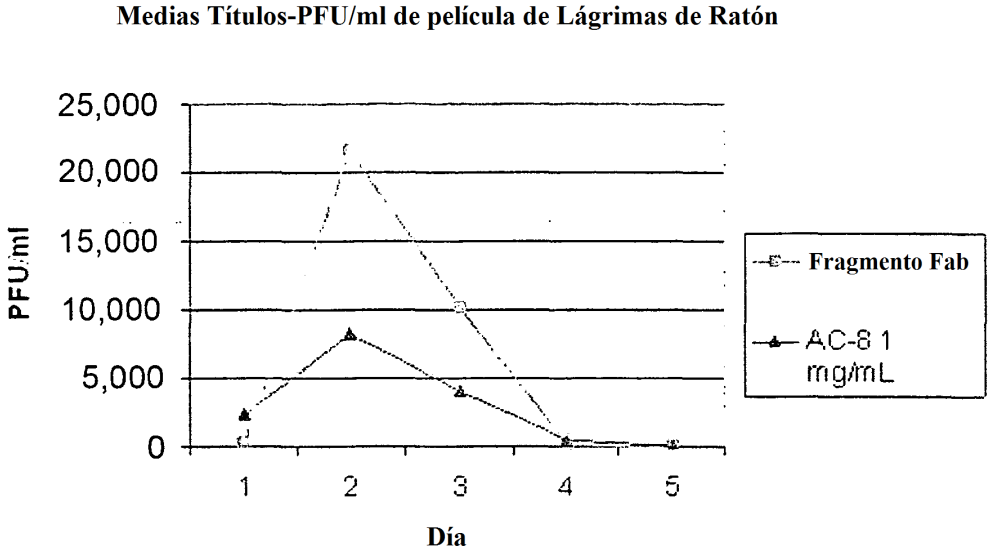

Medias Títulos-PFU/ml de película de Lágrimas de Ratón
25,000
20,000
15,000
10,000
5,000
0
PFU/ml
1
2
3
4
5
Día
Fragmento Fab
AC-8 1 mg/mL

FIG. 4

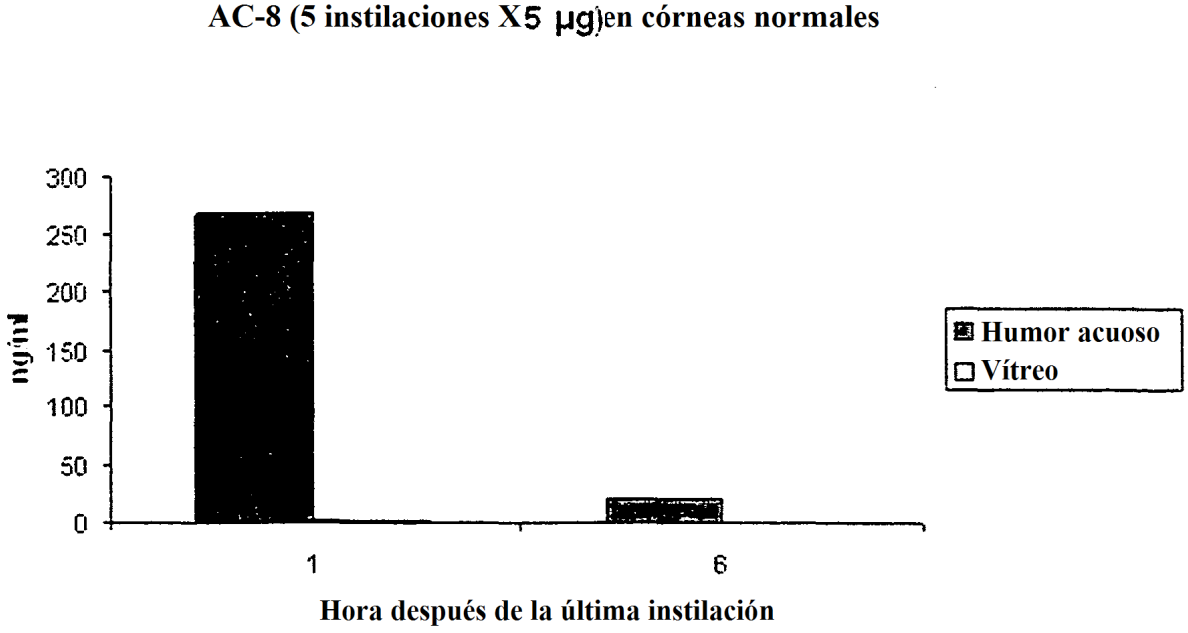

AC-8 (5 instilaciones X5 µg)en córneas normales
300
250
200
150
100
50
0
ng/ml
1
6
Hora después de la última instilación
Humor acuoso
Vítreo

FIG. 5

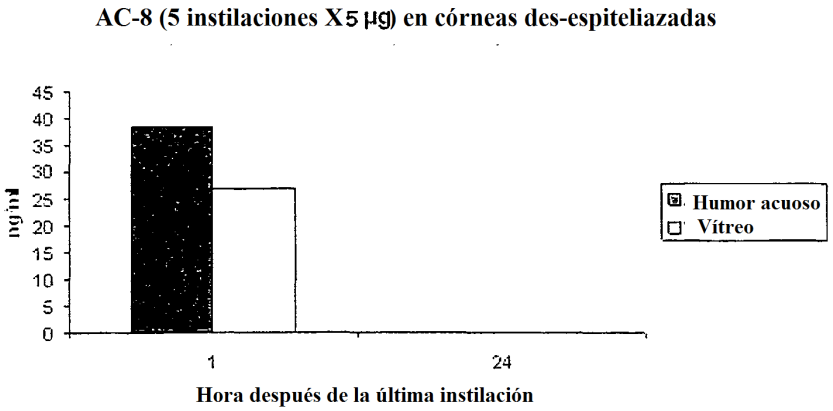
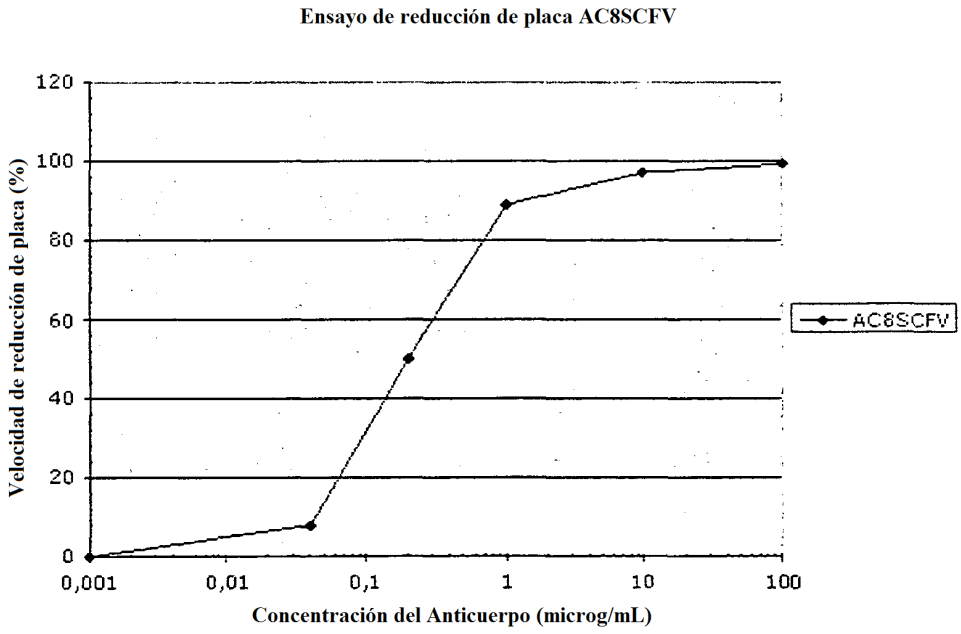

AC-8 (5 instilaciones X5 µg) en córneas des-espiteliazadas
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
1
24
Hora después de la última instilación
Humor acuoso
Vítreo

FIG. 6


Ensayo de reducción de placa AC8SCFV
120
100
80
60
40
20
0
Velocidad de reducción de placa (%)
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Concentración del Anticuerpo (microg/mL)
AC8SCFV