

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 399**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2007 PCT/CH2007/000334**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2008 WO08006235**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2007 E 07763939 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2046382**

54 Título: **Anticuerpos scFv que atraviesan capas epiteliales y/o endoteliales**

30 Prioridad:

10.07.2006 US 819378 P

06.02.2007 US 899907 P

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

27.02.2017

73 Titular/es:

**ESBATECH, AN ALCON BIOMEDICAL
RESEARCH UNIT LLC (100.0%)**

**Wagistrasse 21
8952 Schlieren, CH**

72 Inventor/es:

**AUF DER MAUR, ADRIAN;
BARBERIS, ALCIDE;
URECH, DAVID y
LICHTLEN, PETER**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 603 399 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos scFv que atraviesan capas epiteliales y/o endoteliales

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo scFv con características mejoradas para la penetración en tejidos y su aplicación tópica en el diagnóstico y tratamiento de una enfermedad que depende de la sobreexpresión de un antígeno seleccionado. En particular, la invención se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a e inactiva dicho antígeno seleccionado.

Antecedentes de la invención

10 El tratamiento local de muchas enfermedades puede producirse mediante la aplicación tópica de un fármaco que debe penetrar en el tejido epitelial. Las células epiteliales adyacentes se sellan mediante uniones estrechas, impidiendo el paso de la mayor parte de moléculas disueltas de un lado de la lámina epitelial al otro (Alberts *et al.*, Molecular Biology of the Cell, 2ª ed.). Las uniones estrechas son cruciales para la formación y el mantenimiento de la barrera paracelular y para la polaridad celular en epitelios y endotelios simples. También desempeñan un papel importante en la barrera hematoencefálica, donde controlan las sustancias que abandonan o entran en el cerebro.
15 Es necesario que fármacos de alto peso molecular atraviesen estas barreras tisulares para alcanzar sus sitios de acción. En general, los anticuerpos son demasiado grandes como para cruzar las uniones estrechas de las capas de células epiteliales.

20 Como parte de la actividad normal del organismo, las uniones estrechas se abren y cierran selectivamente en respuesta a diversas señales tanto en el interior como en el exterior de las células. Esto permite el paso de grandes moléculas o incluso de células completas a través de la barrera de unión estrecha.

25 La administración mucosa de compuestos terapéuticos puede ofrecer determinadas ventajas con respecto a la inyección y otros modos de administración, por ejemplo, en cuanto a la conveniencia y velocidad de administración, así como al reducir o eliminar problemas de cumplimiento y los efectos secundarios que acompañan a la administración mediante inyección. Sin embargo, la administración mucosa de agentes biológicamente activos está limitada por las funciones de la barrera mucosa y otros factores. Por estos motivos, la administración mucosa de fármacos requiere normalmente mayores cantidades de fármaco que la administración mediante inyección. Otros compuestos terapéuticos, incluyendo fármacos de molécula grande, péptidos y proteínas, son a menudo resistentes a la administración mucosa.

30 La capacidad de los fármacos para permear superficies mucosas, sin asistencia por parte de agentes de potenciación de la administración, parece estar relacionada con varios factores, incluyendo el tamaño molecular, la liposolubilidad y la ionización. Las moléculas pequeñas, de menos de aproximadamente 300-1.000 Dalton, a menudo pueden penetrar en las barreras mucosas, sin embargo, a medida que aumenta el tamaño molecular, la permeabilidad disminuye rápidamente. Los compuestos liposolubles son generalmente más permeables a través de superficies mucosas que las moléculas no liposolubles. Los péptidos y las proteínas son escasamente liposolubles, y así presentan escasas características de absorción a través de superficies mucosas.
35

40 El documento US2006062758 proporciona composiciones y métodos que incluyen un agente biológicamente activo y un péptido de permeabilización eficaz para potenciar la administración mucosa del agente biológicamente activo en un sujeto mamífero. El péptido de permeabilización potencia reversiblemente el transporte paracelular epitelial mucoso, normalmente modulando la estructura y/o fisiología de la unión epitelial en una superficie epitelial mucosa en el sujeto.

Se han descrito previamente péptidos que pueden modular la función de uniones estrechas epiteliales (Johnson, P. H. y Quay, S. C., 2000). El documento CA2379661 proporciona un sistema de administración paracelular de fármacos que comprende un péptido derivado de claudina 6. Las claudinas representan una superfamilia de proteínas integrales de membrana ubicadas en las uniones estrechas y que proporcionan la función de barrera.

45 Los anticuerpos son poderosas herramientas para la investigación en biología molecular y bioquímica y se aplican ampliamente en terapia y diagnóstico médicos debido a su capacidad para unirse específicamente a su antígeno con alta afinidad. Normalmente, los anticuerpos consisten en dos cadenas pesadas y dos ligeras, que se unen covalentemente entre sí mediante enlaces disulfuro. Un dominio altamente variable que comprende tres regiones complementarias (CDR) está situado en el extremo N-terminal de cada cadena. De manera concertada, las regiones variables de la cadena pesada y ligera determinan la especificidad de antígeno del anticuerpo. Se han modificado mediante ingeniería anticuerpos de cadena sencilla (scFv) mediante la unión de las secuencias de ADN que codifican para dominios variables de cadena pesada (VH) y variables de cadena ligera (VL) con una secuencia espaciadora que codifica para un ligador de aminoácidos flexible (Bird *et al.*, 1988).
50

Este formato tiene las ventajas con respecto a anticuerpos de longitud completa convencionales que un scFv está codificado por un único gen, pueden introducirse fácilmente mutaciones y el scFv resultante puede expresarse en sistemas de levaduras y procariotas, que permiten una rápida selección de agentes de unión de alta afinidad específicos prácticamente a cualquier epítipo mediante simple biología molecular. Debido a su falta de función efectora, los anticuerpos scFv no ejercen efectos tóxicos mediante citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento o dependiente de anticuerpos (ADCC o CDCC, respectivamente), y a diferencia de los anticuerpos de longitud completa, los anticuerpos scFv muestran buenas capacidades de penetración en tejidos.

Se han generado muchos anticuerpos de cadena sencilla (scFv) contra una multitud de diferentes antígenos, en particular porque pueden seleccionarse fácilmente por su alta capacidad de unión usando técnicas tales como presentación en fago o presentación en ribosoma. Además, pueden producirse anticuerpos scFv en sistemas microbianos que se asocian con menores costes en comparación con la producción de anticuerpos terapéuticos de longitud completa.

Además de las aplicaciones *in vitro* y extracelulares convencionales, los scFv también se han usado satisfactoriamente para aplicaciones intracelulares (Worn *et al.* 2000; Auf der Maur *et al.* 2002; Stocks MR, 2004); por tanto, se han desarrollado scFv dirigidos contra antígenos intracelulares. En general, la expresión intracelular de scFv funcionales está limitada por su inestabilidad, insolubilidad y tendencia a formar agregados. Por este motivo, se han desarrollado satisfactoriamente sistemas de examen *in vivo* para anticuerpos scFv, que son particularmente solubles y estables en las condiciones reductoras típicas para el entorno intracelular (por ejemplo, núcleo, citoplasma) usando un denominado examen de "control de calidad" (documento WO0148017; Auf der Maur *et al.* (2001); Auf der Maur *et al.*, 2004) y han conducido a la identificación de secuencias de entramado de scFv particularmente estables y solubles para tales fines (documento WO03097697). Además, estas secuencias de entramado muestran niveles de expresión excepcionales y propiedades potenciadas de estabilidad y solubilidad también en las condiciones oxidantes naturales en el entorno extracelular. Así, estas propiedades biofísicas y bioquímicas favorables se traducen en altos rendimientos de producción favorables y permiten que estos fragmentos de anticuerpo, una vez dirigidos contra antígenos específicos, se apliquen localmente y/o de manera sistémica como productos terapéuticos proteicos en áreas terapéuticas particulares.

Para el uso de anticuerpos en muchas aplicaciones terapéuticas, en particular aplicaciones locales, un factor importante es la capacidad del anticuerpo para penetrar en tejidos, y en particular barreras de tejido epitelial.

La aplicación local es particularmente deseable para el tratamiento de trastornos que se manifiestan en un lugar particular y no requieren un tratamiento sistémico, por ejemplo, enfermedades oculares.

Uveítis anterior

La uveítis es una inflamación aguda o crónica de la úvea con una prevalencia de 30 - 40 por 100.000 (Lightman y Kok 2002). La uveítis se subdivide según la ubicación en uveítis anterior, intermedia o posterior. La uveítis anterior evoluciona a uveítis posterior seguido por complicaciones tales como cataratas, retinitis e incluso ceguera, si no se trata (Kok y Lightman 2004). En personas de <65 años de edad, existen muchos individuos legalmente ciegos como resultado de uveítis como retinopatía diabética (Kok y Lightman 2004). La uveítis anterior, como la forma más común de enfermedades inflamatorias intraoculares, se asocia con el alelo de locus A de histocompatibilidad B27 (HLA-B27) en el 50% de los casos (Power *et al.* 1998). De estos pacientes, sólo aproximadamente la mitad padecen una enfermedad sistémica adicional tal como espondilitis anquilosante o enfermedad inflamatoria crónica del intestino (El-Shabrawi y Hermann 2002). El tratamiento de uveítis tiene como objetivo principalmente el control del proceso inflamatorio (Kok y Lightman 2004). Actualmente, los corticosteroides son el pilar para la terapia de uveítis (Kok y Lightman 2004). De manera importante, el tratamiento local y sistémico con corticosteroides aumenta significativamente el riesgo de glaucoma y cataratas, limitando por tanto su uso repetido (El-Shabrawi y Hermann 2002). Otros tratamientos que incluyen metotrexato, ciclosporina o azatioprina requieren un mínimo de tratamiento de 6 semanas para producir un efecto, dejando a los pacientes con una enorme restricción de su calidad de vida durante un periodo prolongado (El-Shabrawi y Hermann 2002, Dick *et al.* 1997).

A partir de lo anterior, es obvia una necesidad médica claramente definida. Los corticosteroides tópicos como la opción terapéutica más común tienen efectos secundarios significativos que, de hecho, agravan el riesgo a largo plazo de ceguera.

Recientemente, se han encontrado concentraciones de TNF α de 15 pg/ml en el humor acuoso de pacientes con uveítis, mientras que los niveles correspondientes en individuos sanos fueron de 0,56 pg/ml (Perez-Guijo *et al.* 2004). Varios pequeños estudios clínicos realizados con inhibidores de TNF α aplicados de manera sistémica notifican "una mejora inmediata" (El-Shabrawi y Hermann 2002) o "una mejora clínica notable en el plazo de días" (Murphy *et al.* 2004) o "en el plazo de 2 semanas" (Joseph 2003) o "una mejora inmediata significativa después de la primera dosis de infliximab" (Benitez Del Castillo *et al.* 2004).

Por tanto, el concepto de seleccionar TNF α como diana está bien validado clínicamente. Sin embargo, sigue habiendo preocupaciones de seguridad relacionadas con la aplicación sistémica de inhibidores de TNF α y no justificarían su uso en la fracción significativa de pacientes con uveítis que carecen de manifestaciones adicionales de enfermedad sistémica.

- 5 Por tanto, un inhibidor de TNF α tópico atenderá una necesidad médica bien definida, especialmente en pacientes con uveítis anterior. Debido a su alto peso molecular, los inhibidores de TNF α comercializados no son aplicables de manera tópica (véase Thiel *et al.* 2002).

Enfermedad de Behçet

10 La enfermedad de Behçet es una enfermedad idiopática, multisistémica, crónica y recurrente, caracterizada de manera clásica por crisis inflamatorias oculares agresivas, úlceras bucogenitales y lesiones de la piel. En casos graves, poco frecuentes de la enfermedad de Behçet, además puede observarse afectación articular, audiovestibular, torácica, gastrointestinal, cardiovascular, renal o del SNC. El ojo es el órgano interno más comúnmente implicado en la enfermedad de Behçet y es la causa principal de morbilidad crónica en pacientes. La enfermedad ocular consiste en iridociclitis unilateral (20%) o bilateral (80%), hipopión o panuveítis que discurren con un transcurso crónico y con recidivas. En general, las reagudizaciones iniciales tienden a ser más anteriores y unilaterales, mientras que las crisis posteriores implican la cavidad vítrea y el segmento posterior del ojo, volviéndose bilateral (Evereklioglu 2005). Se observa más comúnmente uveítis grave entre pacientes de regiones endémicas tales como pacientes japoneses y turcos, afectando al 70-90% de esta población (Özen 1999; Tursen *et al.*, 2003; Tugal-Tutkun *et al.*, 2004; Yurdakul *et al.*, 2004; Evereklioglu 2005). El riesgo de pérdida visual aumenta progresivamente, alcanzando una cuarta parte de los casos a los 10 años. Además, la ceguera legal es significativa y eventualmente se deriva en más del 50% de los casos en países con alta prevalencia y gravedad de la enfermedad, tal como Japón (Boyd *et al.*, 2001; Evereklioglu 2005).

25 La enfermedad de Behçet presenta una clara variación geográfica y es de manera endémica mayor particularmente en Japón, Corea, Arabia Saudí, Irán y Turquía así como en los países a lo largo de la antigua "ruta de la seda", incluyendo China e Israel (Bonfioli y Orefice 2005; Evereklioglu 2005). Por ejemplo, la enfermedad de Behçet representa el 20% de los casos de uveítis en Japón y Turquía en comparación con sólo el 0,2% en los EE.UU. En países en los que la enfermedad es endémica, es más grave, con una mayor frecuencia de manifestaciones y complicaciones oculares y es más común en los hombres, especialmente adultos jóvenes de sexo masculino (Evereklioglu 2005). Esta epidemiología peculiar parece estar mediada por una combinación de genética (tal como asociación con el alelo HLA-B51 (Sakane *et al.*, 1999; Verity *et al.*, 1999; Evereklioglu 2005), agentes infecciosos (Direskeneli 2001; Evereklioglu 2005) y factores ambientales. La prevalencia estimada de la enfermedad de Behçet es de entre 1:10.000 y 1:1000 en los países mediterráneos, Oriente Medio y Extremo Oriente. En Japón y los países asiáticos a lo largo de la ruta de la seda, la prevalencia es de 13-30 por 100.000 y tiene su mayor valor en las zonas septentrionales de Japón; la mayor prevalencia global con hasta 400 por cada 100.000 se observa en determinadas partes de Turquía. Hay aproximadamente 15.000 personas con enfermedad de Behçet en los EE.UU. (Zierhut *et al.*, 2003; Evereklioglu 2005).

40 Las consecuencias de las crisis inflamatorias oftálmicas son la principal causa de morbilidad crónica en pacientes con enfermedad de Behçet (Evereklioglu 2005). El tratamiento de la enfermedad de Behçet es sintomático y empírico. Como en otras formas de uveítis, los corticosteroides tópicos, perioculares y sistémicos representan el pilar de la terapia en la enfermedad de Behçet ocular. Sin embargo, el uso de modalidades de tratamiento basadas en corticosteroides en los pacientes está limitado por su perfil significativo de efectos secundarios. Además, los corticosteroides rara vez inducen remisiones completas en la enfermedad de Behçet ocular y una fracción significativa de pacientes desarrolla enfermedad resistente a esteroides con el tiempo (Evereklioglu 2005). En el transcurso de la enfermedad, los tratamientos comprenden frecuentemente agentes inmunosupresores tales como azatioprina, metotrexato y ciclosporina A. Sin embargo, como estos agentes también se asocian con preocupaciones de seguridad críticas, existe una necesidad médica bien expresada de una modalidad de tratamiento novedosa eficaz y segura en esta indicación.

50 Además de los recientes hallazgos epidemiológicos que sugieren variaciones polimórficas en TNF α que se asocian con la gravedad de la enfermedad de Behçet (Verity *et al.*, 1999b), existe una amplia variedad de casos clínicos y pequeños ensayos clínicos que describen el uso de infliximab en la enfermedad de Behçet ocular (Ohno *et al.*, 2004; Wechsler *et al.*, 2004; Giansanti *et al.*, 2004; Lanthier *et al.*, 2005; Tugal-Tutkun *et al.*, 2005; Lindstedt *et al.*, 2005). De hecho, todos estos estudios notifican una remisión rápida y completa de la enfermedad de Behçet ocular, incluso en pacientes resistentes a la terapia convencional (Tugal-Tutkun *et al.*, 2005). Sin embargo, la frecuencia y gravedad de los acontecimientos adversos en pacientes con uveítis tratados con infliximab son inesperadamente altas en algunos estudios, limitando, por tanto, el potencial de antagonistas de TNF α aplicados de manera sistémica para el tratamiento de esta enfermedad (Rosenbaum 2004; Suhler *et al.*, 2005).

La validación clínica de TNF α como diana farmacológica altamente atractiva en la enfermedad de Behçet ocular

(Ohno *et al.*, 2004; Wechsler *et al.*, 2004; Giansanti *et al.*, 2004; Lanthier *et al.*, 2005; Tugal-Tutkun *et al.*, 2005; Lindstedt *et al.*, 2005) y las aparentes preocupaciones de seguridad con la supresión de TNF α sistémica en pacientes con uveítis (Rosenbaum 2004; Suhler *et al.*, 2005), revela que existe la necesidad del desarrollo de un antagonista de TNF α aplicable de manera tópica para la enfermedad de Behçet ocular, especialmente para

5
Debido a sus buenas capacidades de penetración en tejidos y su rápido aclaramiento renal, se prefieren anticuerpos scFv para aplicaciones locales. Además de la carga, hidropaticidad y peso molecular, propiedades tales como solubilidad, tendencia a la agregación y estabilidad influyen en la capacidad de una molécula para penetrar a través de barreras tisulares. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo altamente soluble puede no ser capaz de penetrar en

10
barreras epiteliales si forma agregados a temperatura fisiológica de aproximadamente 37°C. La mutación de un único residuo de aminoácido en una región de entramado de scFv puede mejorar por otro lado su solubilidad a temperatura ambiental, y esta mutación puede alterar la estabilidad térmica y conducir por tanto a desplegamiento parcial y agregación a 37°C. Tales agregados, debido a su mayor peso molecular, ya no pueden atravesar barreras tisulares.

15
Debido a que la penetración en tejidos es un factor importante para la administración eficaz de fármacos, en particular en aplicaciones locales, existe la necesidad de anticuerpos terapéuticos, en particular anticuerpos scFv con capacidades mejoradas de penetración en tejidos además de las características deseables por lo demás de alta estabilidad y baja antigenicidad. El documento WO0040262 da a conocer fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, scFv, como productos farmacéuticos o herramientas de diagnóstico para tratar o diagnosticar, respectivamente,

20
trastornos oculares. Los experimentos de penetración ocular se realizan a concentraciones de 0,2 a 0,25 mg/ml de scFv. Se mostró que un scFv podía penetrar en la barrera epitelial de la córnea a una tasa muy baja en ausencia, y a mayores tasas en presencia de potenciadores de la penetración. Puesto que los potenciadores de la penetración pueden tener efectos citotóxicos o provocar alteraciones epiteliales, existe la necesidad de métodos alternativos y/o mejorados para el tratamiento de enfermedades oculares mediante scFv y fragmentos de los mismos. En particular,

25
son necesarios anticuerpos para terapia controlada mediante administración local con un bajo grado de efectos secundarios, que puedan administrarse a una concentración relativamente alta.

Sumario de la invención

Por tanto, es un objeto general de la invención proporcionar un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo scFv, que se une específicamente a un antígeno seleccionado y tiene capacidad mejorada de penetración en tejidos.

30
A continuación, para implementar estos y todavía otros objetos de la invención, que resultarán más fácilmente evidentes a medida que avance la descripción, dicho anticuerpo se manifiesta por la característica de que puede obtenerse mediante un método que comprende

(i) seleccionar de una reserva de regiones de entramado solubles y estables, la región de entramado que concuerde mejor con la región de entramado de un anticuerpo no humano de una especificidad de unión a antígeno

35
seleccionada,

(ii) o bien proporcionar a dicha región de entramado CDR que se unen a dicho antígeno o bien mutar la región de entramado de dicho anticuerpo no humano a la secuencia de dicha región de entramado soluble y estable,

(iii) someter a prueba el anticuerpo generado para determinar su solubilidad y estabilidad, y

(iv) someter a prueba el anticuerpo generado para determinar su unión a antígeno.

40
Opcionalmente, entre las etapas (ii) y (iii) se añade la siguiente etapa:

- mutar dicho anticuerpo scFv mediante mutagénesis dirigida al sitio o al azar de una o más CDR seleccionadas y/o la región de entramado.

La invención se refiere a una composición que comprende un polipéptido de unión a antígeno soluble, en la que el polipéptido de unión a antígeno puede cruzar una o más capas epiteliales, por ejemplo, una capa endotelial o capa

45
mesotelial, en menos de aproximadamente 8 horas. La invención está definida por las reivindicaciones. En particular, la invención proporciona una composición farmacéutica formulada para la aplicación local a una superficie de una barrera de tejido epitelial, comprendiendo dicha composición un polipéptido de unión a antígeno soluble y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que dicho polipéptido de unión a antígeno puede cruzar una córnea de mamífero intacta en menos de 8 horas en ausencia de un potenciador de la penetración, y en

50
la que dicho polipéptido de unión a antígeno es un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) y comprende: (a) una región de entramado de dominio variable de cadena ligera (VL) de una similitud de al menos el 85% con una región de entramado de VL seleccionada del grupo que consiste en las SEQ. ID. NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7; y una región de

entramado de dominio variable de cadena pesada (VH) de una similitud de al menos el 85% con una región de entramado de VH seleccionada del grupo que comprende SEQ. ID. NO: 8, 9, 10 y 11; o (b) la secuencia de SEQ. ID. NO: 13.

5 Por ejemplo, el polipéptido de unión a antígeno puede cruzar una o más capas epiteliales en menos de aproximadamente 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, o menos horas. En una realización, el polipéptido de unión a antígeno puede cruzar una capa o capas epiteliales en menos de aproximadamente 4 horas. Ha de entenderse que todos los valores e intervalos entre estos valores e intervalos pretenden estar englobados por la presente invención.

La capa epitelial es del ojo, en particular de la córnea, por ejemplo, el epitelio y/o endotelio de la córnea.

10 El polipéptido de unión a antígeno puede cruzar una córnea de mamífero intacta en menos de aproximadamente 8 horas en ausencia de un potenciador de la penetración. Por ejemplo, el polipéptido de unión a antígeno puede cruzar una córnea de mamífero intacta en menos de aproximadamente 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o menos horas. En una realización, el polipéptido de unión a antígeno puede cruzar una córnea humana intacta. En una realización, el polipéptido de unión a antígeno puede cruzar una córnea de cerdo o conejo intacta.

15 En todavía otras realizaciones, la composición comprende además un potenciador de la penetración. En determinadas realizaciones, el potenciador de la penetración se selecciona del grupo que consiste en Azone®, cloruro de benzalconio (BzCl), BL-7, BL-9, Brij 35, Brij 78, Brij 98, Brij 99, polioxietileno-polioxipropileno 1800, caprato de sodio, ácido caprílico, cloruro de cetilpiridinio, clorhexidina, colato, aceite de ricino, aceite de maíz, Cremophor-EL, ciclodextrinas, DMSO, bromuro de decametonio, desoxicolato, sulfato de dextrano, EDTA, edetato de disodio, etanol, fusidato, glicocolato, laurilsulfato, L- α -lisofosfatidilcolina, metazolamida, N-lauroilsarcosina, NMP, ácido oleico, péptido Pz, fosfolípidos, lauril éter de polioxietileno-9, saponina, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, taurocolato y taurodesoxicolato. En otra realización, el potenciador de la penetración es caprato de sodio. En aún otra realización, el potenciador de la penetración incluye sistemas coloidales, poliácridatos y polímero bioadhesivo.

25 Las moléculas de la invención pueden cruzar una capa epitelial, por ejemplo, una capa epitelial del ojo (córnea) en ausencia de un potenciador de la penetración.

En algunas realizaciones, el polipéptido tiene una afinidad de unión por un antígeno diana de una kD de al menos $10E-6$ M o mejor.

30 En algunos aspectos, la composición proporcionada por la invención tiene un pH de menos de aproximadamente 8, en la que el polipéptido de unión a antígeno es suficientemente soluble como para transitar por una córnea intacta. En algunas realizaciones, la composición tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 6 a aproximadamente 8. En otras realizaciones, la composición tiene un pH de aproximadamente 6, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 o cualquier valor incremental del mismo. Se entiende que cualquier valor e intervalo entre estos valores e intervalos pretende estar englobado por la presente invención.

35 En algunos aspectos, la composición proporcionada por la presente invención se formula a aproximadamente pH 8 o menos y el polipéptido de unión a antígeno es suficientemente soluble como para transitar por una córnea intacta en menos de aproximadamente 8 horas. En algunas realizaciones, el polipéptido de unión a antígeno es suficientemente soluble como para transitar por una córnea intacta en menos de aproximadamente 4 horas. En otras realizaciones, la composición comprende además un agente de potenciación de la penetración. En algunas realizaciones, el agente de potenciación de la penetración se selecciona del grupo que consiste en Azone, cloruro de benzalconio (BzCl), BL-7, BL-9, Brij 35, Brij 78, Brij 98, Brij 99, polioxietileno-polioxipropileno 1800, caprato de sodio, ácido caprílico, cloruro de cetilpiridinio, clorhexidina, colato, aceite de ricino, aceite de maíz, Cremophor-EL, DMSO, bromuro de decametonio, desoxicolato, sulfato de dextrano, EDTA, edetato de disodio, etanol, fusidato, glicocolato, laurilsulfato, L- α -lisofosfatidilcolina, N-lauroilsarcosina, NMP, ácido oleico, fosfolípidos, lauril éter de polioxietileno-9, saponina, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, taurocolato y taurodesoxicolato. En algunas realizaciones, el agente de potenciación de la penetración es caprato de sodio. En algunas realizaciones, el agente de potenciación de la penetración es clorhexidina.

50 En algunos aspectos, el polipéptido de unión a antígeno puede cruzar una o más capas de una córnea intacta en menos de aproximadamente 8 horas. En otros aspectos, la composición proporcionada por la presente invención comprende el polipéptido de unión a antígeno (es decir, anticuerpo de cadena sencilla) a una concentración mayor de aproximadamente 2,5 mg/ml, en la que el polipéptido es suficientemente soluble como para transitar por una córnea intacta en menos de aproximadamente 8 horas. La composición puede comprender el polipéptido de unión a antígeno a una concentración en el intervalo de desde mayor de aproximadamente 2,5 mg/ml hasta mayor de aproximadamente 10,0 mg/ml. Por ejemplo, la composición puede comprender el polipéptido de unión a antígeno a una concentración de aproximadamente 2,5 mg/ml, 3,0 mg/ml, 3,5 mg/ml, 4,0 mg/ml, 4,5 mg/ml, 5,0 mg/ml, 5,5 mg/ml, 6,0 mg/ml, 6,5 mg/ml, 7,0 mg/ml, 7,5 mg/ml, 8,0 mg/ml, 8,5 mg/ml, 9,0 mg/ml, 9,5 mg/ml, a mayor de

5 aproximadamente 10,0 mg/ml, o cualquier valor incremental del mismo. Ha de entenderse que todos los valores e intervalos entre estos valores e intervalos pretenden estar englobados por la presente invención. En algunas realizaciones, el polipéptido de unión a antígeno está a una concentración mayor de aproximadamente 4,0 mg/ml. En otras realizaciones, el polipéptido de unión a antígeno está a una concentración mayor de aproximadamente 10,0 mg/ml.

10 En aún otras realizaciones, el polipéptido de unión a antígeno es suficientemente soluble como para transitar por una córnea intacta en menos de aproximadamente 4 horas en ausencia de un potenciador de la penetración. En otras realizaciones, la composición comprende además un agente de potenciación de la penetración. En algunas realizaciones, el agente de potenciación de la penetración se selecciona del grupo que consiste en Azone, cloruro de benzalconio (BzCl), BL-7, BL-9, Brij 35, Brij 78, Brij 98, Brij 99, polioxietileno-polioxipropileno 1800, caprato de sodio, ácido caprílico, cloruro de cetilpiridinio, clorhexidina, colato, aceite de ricino, aceite de maíz, Cremophor-EL, DMSO, bromuro de decametonio, desoxicolato, sulfato de dextrano, EDTA, edetato de disodio, etanol, fusidato, glicocolato, laurilsulfato, L- α -lisofosfatidilcolina, N-lauroilsarcosina, NMP, ácido oleico, fosfolípidos, lauril éter de polioxietileno-9, saponina, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, taurocolato y taurodesoxicolato. En algunas realizaciones, el agente de potenciación de la penetración es caprato de sodio. En otras realizaciones, el agente de potenciación de la penetración es clorhexidina.

20 En algunos aspectos, el polipéptido de unión a antígeno (es decir, anticuerpo de cadena sencilla), tiene una afinidad de unión por un antígeno diana de una kD de al menos $10E-6$ M y es suficientemente soluble como para transitar por una unión estrecha epitelial, y en la que el polipéptido sigue estando en forma monomérica en condiciones fisiológicas.

25 En otros aspectos, el polipéptido de unión a antígeno es estable a una temperatura de desde aproximadamente -80 grados centígrados hasta aproximadamente 37 grados centígrados. Por ejemplo, la composición puede ser estable a una temperatura de -80 grados centígrados, -70 grados centígrados, -60 grados centígrados, -50 grados centígrados, -40 grados centígrados, -30 grados centígrados, -20 grados centígrados, -10 grados centígrados, 0 grados centígrados, 10 grados centígrados, 20 grados centígrados, o 30 grados centígrados, o cualquier valor incremental del mismo. Ha de entenderse que todos los valores e intervalos entre estos valores e intervalos pretenden estar englobados por la presente invención. En algunas realizaciones, el polipéptido de unión a antígeno sigue siendo estable durante al menos aproximadamente ocho semanas. En otras realizaciones, el polipéptido de unión a antígeno sigue siendo estable durante al menos seis semanas a 4 grados centígrados.

30 En algunos aspectos, el polipéptido de unión a antígeno tiene las características farmacodinámicas o farmacocinéticas mostradas experimentalmente en la totalidad de cualquiera de las figuras dadas a conocer en el presente documento.

35 En otros aspectos, el polipéptido de unión a antígeno tiene una afinidad de unión por un antígeno diana de una kD de al menos $10E-6$ M o mejor y es suficientemente soluble como para transitar por una unión estrecha epitelial en menos de aproximadamente 8 horas. En algunas realizaciones, el polipéptido de unión a antígeno es suficientemente soluble como para transitar por una unión estrecha epitelial en aproximadamente 4 horas o menos.

40 En todavía aún otros aspectos, el polipéptido de unión a antígeno tiene una afinidad de unión por un antígeno diana de una kD de al menos $10E-6$ M o mejor y tiene un valor de $\frac{1}{2}$ V_{max} correspondiente a la cinética de tránsito de un polipéptido de unión a antígeno que puede cruzar una unión estrecha epitelial en menos de aproximadamente 8 horas.

45 En otros aspectos, el polipéptido de unión a antígeno es suficientemente soluble como para transitar por una unión estrecha epitelial tal como se mide en un ensayo de monocapa de células epiteliales Caco-2 (adenocarcinoma de colon humano) convencional, de modo que sea adecuado para su uso en terapia. En diversos aspectos, el polipéptido de unión a antígeno es suficientemente soluble como para transitar por una unión estrecha epitelial tal como se mide en un ensayo de permeabilidad con yeyuno de ratón convencional, de modo que sea adecuado para su uso en terapia. En aún otros aspectos, el polipéptido de unión a antígeno es suficientemente soluble como para transitar por una unión estrecha epitelial tal como se predice mediante ensayos de solubilidad de un híbrido o doble híbrido intracelulares convencionales, de modo que sea adecuado para su uso en terapia. En todavía aún otros aspectos, el polipéptido de unión a antígeno es suficientemente soluble como para transitar por una unión estrecha epitelial tal como se predice mediante un ensayo de precipitación con PEG convencional o un ensayo de cromatografía de autointeracción (SIC), de modo que sea adecuado para su uso en terapia.

55 También se describe en el presente documento un método para identificar un polipéptido de unión a antígeno que tiene un valor de $\frac{1}{2}$ V_{max} correspondiente al tránsito del polipéptido de unión a antígeno a través de una unión estrecha epitelial en menos de aproximadamente 8 horas. El método comprende: expresar de manera intracelular polipéptidos de unión a antígeno candidatos en células huésped que tienen un sistema de gen indicador inducible, en el que el sistema de gen indicador produce una señal registrable cuando está en presencia de un polipéptido de

unión a antígeno que tiene dicha cinética de tránsito; y examinar dichas células para detectar una señal registrable, en el que la presencia de dicha señal identifica un polipéptido candidato como polipéptido de unión a antígeno que tiene dicha cinética de tránsito. Un polipéptido de unión a antígeno identificado mediante este método se describe en el presente documento. También se describe en el presente documento un kit para llevar a cabo este método.

5 Se describe además en el presente documento el tratamiento de un paciente con un estado ocular administrando de manera tópica una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de unión a antígeno dado a conocer en el presente documento, de tal manera que se logra el tratamiento. El estado ocular puede ser uveítis, o degeneración macular asociada a la edad.

10 Se describe además en el presente documento un polipéptido de unión a antígeno que comprende una región de polipéptido que tiene al menos un motivo de unión a antígeno flanqueado por al menos una región de armazón y en el que el polipéptido tiene una cinética de tránsito suficiente como para cruzar una unión estrecha epitelial en menos de aproximadamente 8 horas. El polipéptido puede comprender un motivo de unión a antígeno flanqueado por dos regiones de armazón, dos motivos de unión a antígeno flanqueados por tres regiones de armazón, tres motivos de unión a antígeno flanqueados por cuatro regiones de armazón, o seis motivos de unión a antígeno flanqueados por ocho regiones de armazón con una región de ligador intermedio entre las regiones de armazón cuarta y quinta. El motivo de unión a antígeno también puede ser una CDR y la región de armazón puede ser una región de entramado de inmunoglobulina. El polipéptido también puede comprender tres CDR y cuatro regiones de entramado intermedias o seis CDR y ocho regiones de entramado y una región de ligador intermedio.

20 Se describe además en el presente documento un polipéptido de unión a antígeno que puede unirse específicamente a un antígeno diana y que tiene una cinética de tránsito suficiente como para cruzar una unión estrecha epitelial en menos de aproximadamente 8 horas y en el que el polipéptido está representado por la fórmula:

Y; o

Z; o

Y-L-Z; o

25 Z-L-Y;

siendo Y [F1-CDR1-F2-CDR2-F3-CDR3 F4] y siendo Z [F5-CDR1-F6-CDR2-F7-CDR3 F8];

30 en la que las regiones de entramado (F1-F4) de Y se derivan de una o más regiones de entramado de cadena sencilla humanas; las regiones de entramado (F5-F6) de Z se derivan de una o más regiones de entramado de cadena sencilla humanas; las CDR (CDR 1-3) de Y se derivan de una o más CDR donadoras que pueden unirse al antígeno diana; las CDR (CDR 4-6) de Z se derivan de una o más CDR donadoras que pueden unirse al antígeno diana; y L es un ligador polipeptídico flexible. Y y Z pueden estar representadas por cualquiera de las secuencias dadas a conocer en el presente documento, o secuencias consenso de las mismas.

35 Alternativamente, pueden introducirse aleatoriamente mutaciones aleatoriamente a lo largo de la totalidad o de parte de la secuencia codificante del polipéptido de unión a antígeno, tal como mediante mutagénesis por saturación. Una "secuencia consenso" es una secuencia formada a partir de los aminoácidos (o nucleótidos) que se producen de la manera más frecuente en una familia de secuencias relacionadas (véase por ejemplo, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania 1987). En una familia de proteínas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido que se produce de la manera más frecuente en esa posición en la familia. Si dos aminoácidos se producen de manera igual de frecuente, puede incluirse cualquiera en la secuencia

40 consenso.

En algunos aspectos, el polipéptido de unión a antígeno se formula para obtener una concentración intraocular de al menos aproximadamente 100 ng/ml o más. En aún otros aspectos, el anticuerpo de cadena sencilla se formula para la administración tópica para producir una concentración intraocular de 100 ng/ml o más basándose en un sistema de modelo celular o animal tal como se da a conocer en el presente documento.

45 En otros aspectos, el polipéptido de unión a antígeno se formula para la aplicación tópica al ojo y puede atravesar la córnea y pasar a un espacio intraocular en ausencia de potenciador de la penetración. Se describe en el presente documento el tratamiento, la prevención o el diagnóstico de una enfermedad o un trastorno ocular usando un polipéptido de unión a antígeno dado a conocer en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

50 Los aspectos, realizaciones, objetos, características y ventajas anteriores y otros de la invención pueden entenderse

con más detalle a partir de la siguiente descripción junto con los dibujos adjuntos. En los dibujos, los caracteres de referencia similares se refieren generalmente a características y elementos estructurales similares en la totalidad de las diversas figuras. Los dibujos no son necesariamente a escala, poniéndose énfasis más bien en ilustrar los principios de la invención.

- 5 La figura 1 muestra los perfiles de elución de ESBA105 (figura 1A), TB-WT (figura 1B) y scFv de Lucentis (figura 1C) de una cromatografía de exclusión molecular preparativa (filtración en gel) tras la etapa de replegamiento. mUA: miliunidades de absorbancia.
- La figura 2 muestra el perfil de elución de una filtración en gel analítica de las fracciones de picos recogidas de ESBA105 después de filtración en gel preparativa.
- 10 La figura 3 muestra la solubilidad de ESBA105 en polietilenglicol (PEG).
- La figura 4 muestra la estabilidad de los anticuerpos scFv ESBA105 y QC 15.2 cuando se almacenan durante dos semanas a diferentes temperaturas y concentraciones. Se separaron los anticuerpos mediante SDS PAGE y se tiñeron con azul brillante de Coomassie.
- 15 La figura 5 muestra la actividad de ESBA105 determinada mediante un ensayo de L929 después de 8 semanas de almacenamiento o bien a 37°C o bien a -80°C, ambos a pH 7,4. Los triángulos indican ESBA105 almacenado a 37°C y los cuadrados ESBA105 almacenado a -80°C.
- La figura 6 muestra esquemáticamente jeringas que retiran líquido de la cavidad vítrea y la cámara anterior, respectivamente. 1 líquido de la cavidad vítrea, 2 líquido ocular de la cámara anterior, 3 iris, 4 córnea, 13 jeringa.
- 20 La figura 7 muestra la penetración de ESBA105 en la cámara anterior de ojos de conejo intactos después de 4 horas.
- La figura 8 muestra la penetración de ESBA105 en la cavidad vítrea de ojos de conejo intactos después de 4 horas.
- La figura 9 muestra la penetración de ESBA105 a través de una capa de células Caco-2.
- 25 La figura 10 muestra una comparación de eficacias de penetración de un anticuerpo de formato de IgG de longitud completa (infiximab) y un fragmento de anticuerpo de formato de cadena sencilla (ESBA105) a través de yeyuno de rata en el modelo de saco no evertido para la absorción intestinal de fármaco. Los cuadrados negros indican la concentración de ESBA105 en nM, los círculos blancos la concentración de infiximab en nM.
- La figura 11a es una representación gráfica de la cantidad de ESBA105 en ng/ml hallada en el humor acuoso de los ojos de conejo de los que se tomaron muestras a lo largo del transcurso del estudio descrito en el ejemplo 7.
- 30 La figura 11b es una representación gráfica de la cantidad de ESBA105 en ng/ml hallada en el humor vítreo de los ojos de conejo de los que se tomaron muestras a lo largo del transcurso del estudio descrito en el ejemplo 7.
- La figura 11c es una representación gráfica de la cantidad de ESBA105 en ng/ml hallada en la neuroretina de los ojos de conejo de los que se tomaron muestras a lo largo del transcurso del estudio descrito en el ejemplo 7.
- La figura 11d es una representación gráfica de la cantidad de ESBA105 en ng/ml hallada en el suero de los ojos de conejo de los que se tomaron muestras a lo largo del transcurso del estudio descrito en el ejemplo 7.
- 35 La figura 12 es una representación gráfica del pK local *in vitro* de ESBA105 en ojos de conejo. Extracto de retina - 500 ng/ml. ELISA de retina 060721 (de ojo de conejo completo n.º 060718).
- La figura 13 es una representación gráfica del tiempo medio local de ESBA105 tras la inyección vítrea en ojos de conejo.
- 40 La figura 14 representa gráficamente el modelado de acumulación local de fármaco después de la administración de ESBA105 (5 gotas/día, ESBA105 10 mg/ml, $P_{ef} = 2,9 \times 10^{-5}$).
- La figura 15 es una representación gráfica del pK del ojo. 4 córnea, 5 película lacrimal, 6 cámara anterior, 7 cristalino, 8 cuerpo vítreo, 9 retina, 10 esclerótica.
- La figura 16 es una representación gráfica de rutas de absorción y eliminación para ESBA105. 11 fármacos hidrófilos, 12 fármacos lipófilos.

La figura 17 muestra datos de dosis-respuesta en un modelo de monoartritis aguda *in vivo* relevante (rata). n= 3, TNF α : 10 μ g entre otros.

La figura 18 A muestra una representación gráfica de los resultados *in vivo* de la aplicación tópica a ojos de conejo. Cada punto de datos representa el promedio de dos conejos (cuatro ojos), que recibieron una gota (30 mcl) de disolución de ESBA105 10 mg/ml en PBS pH 6,5 cada 20 minutos a lo largo de un periodo de tratamiento máximo de 10 horas.

Se aplicaron las gotas encima de la pupila y se apretaron posteriormente los párpados para retirar el fluido en exceso (7 mcl restantes). Se determinaron las concentraciones de ESBA105 en humor acuoso, vítreo y suero mediante ELISA.

La figura 19 muestra una representación gráfica de los resultados *in vivo* de la aplicación tópica a ojos de conejo. Se aplicó una gota de disolución de ESBA105 10 mg/ml al saco ocular inferior de ambos ojos de cada animal cinco veces al día durante hasta 6 días.

Toma de muestras: Después de aplicar la segunda gota en el punto de tiempo indicado (después de 1, 3 ó 6 días) se sacrificaron dos animales y se sometieron ambos ojos, así como el suero a análisis mediante ELISA cuantitativo. Se determinaron los niveles de ESBA105 en el humor acuoso (figura 19A), en el vítreo (figura 19 B), en la neurorretina (figura 19 C), en la coroides (figura 19 D) y en el suero (figura 19 E) tal como se indica.

“Carr” significa portador (*carrier*), lo que significa disolución tampón sin ESBA105. Las barras de datos representan las concentraciones de ESBA105 máxima, la mínima y la mediana medidas en los compartimentos indicados y se facilitan junto con las desviaciones estándar respectivas.

Descripción detallada de la invención

Para proporcionar un entendimiento claro de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, se proporcionan a continuación de manera conveniente las siguientes definiciones.

Definiciones

El término “anticuerpo” se refiere a anticuerpos completos y a cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, “parte de unión a antígeno”, “polipéptido de unión a antígeno” o “agente de unión inmunológico”) o de cadena sencilla de los mismos. Un “anticuerpo” se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro, o una parte de unión a antígeno del mismo. Cada cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada se compone de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera se compone de una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera se compone de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de entramado (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino-terminal hasta el extremo carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a factores o tejidos del huésped, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

El término “unión a antígeno” se refiere a la capacidad para unirse específicamente a un antígeno. Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión englobados dentro del término “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento de un solo dominio o dAb (Ward *et al.*, (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada o (vii) una combinación de dos o más CDR aisladas que pueden unirse opcionalmente mediante un ligador sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento de Fv, VL y VH, están codificados por genes independientes, pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un ligador sintético que permite que se preparen como una sola cadena proteica en la que se aparean las regiones VL y VH para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véanse por ejemplo, Bird *et al.* (1988) Science 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Estos fragmentos de

anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y se examinan los fragmentos para determinar su utilidad de la misma manera que se hace con los anticuerpos intactos.

5 Tal como se usa, "inmunoglobulina" puede referirse a cualquier clase o subclase reconocida de inmunoglobulinas tales como IgG, IgA, IgM, IgD o IgE. La inmunoglobulina puede derivarse de cualquier especie, tales como de origen humano, murino o de conejo. Además, la inmunoglobulina puede ser policlonal, monoclonal o fragmentos. Tales fragmentos de inmunoglobulina pueden incluir, por ejemplo, los fragmentos Fab', F(ab')₂, Fv o Fab, u otros fragmentos de inmunoglobulina que reconozcan antígenos. Tales de fragmentos de inmunoglobulina pueden prepararse, por ejemplo, mediante digestión enzimática proteolítica, por ejemplo, mediante digestión con pepsina o papaína, alquilación reductora o técnicas recombinantes. Los materiales y métodos para preparar tales fragmentos de inmunoglobulina los conocen bien los expertos en la técnica (Parham, (1983) *J. Immunology*, 131:2895; Lamoyi *et al.*, (1983) *J. Immunological Methods*, 56:235; Parham, (1982) *J. Immunological Methods*, 53:133; y Matthew *et al.*, (1982) *J. Immunological Methods*, 50:239).

15 Además, la inmunoglobulina puede ser un anticuerpo de cadena sencilla ("SCA"). Estos pueden consistir en fragmentos Fv de cadena sencilla ("scFv") en los que los dominios variables de cadena ligera ("VL") y variables de cadena pesada ("VH") se unen mediante un puente peptídico o mediante enlaces disulfuro. Además, la inmunoglobulina puede consistir en dominios VH individuales (dab) que presentan actividad de unión a antígeno. Véanse, por ejemplo, G. Winter y C. Milstein, *Nature*, 349, 295 (1991); R. Glockshuber *et al.*, *Biochemistry* 29, 1362 (1990); y E. S. Ward *et al.*, *Nature* 341, 544 (1989).

20 Tal como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere a un polímero de dos o más de los aminoácidos naturales o aminoácidos no naturales. Los polipéptidos de la invención comprenden al menos una secuencia de aminoácidos derivada de una molécula de inmunoglobulina (Ig). En una realización, un polipéptido de la invención comprende una secuencia de aminoácidos o uno o más restos no derivados de una molécula de inmunoglobulina. Se describen modificaciones a modo de ejemplo en más detalle a continuación. Por ejemplo, en una realización, un polipéptido de la invención puede comprender una secuencia de ligador flexible. En otra realización, puede modificarse un polipéptido para añadir un resto funcional (por ejemplo, PEG, un fármaco o un marcador).

30 Los polipéptidos preferidos de la invención comprenden una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de inmunoglobulina humana. Sin embargo, los polipéptidos pueden comprender uno o más aminoácidos de otra especie de mamífero. Por ejemplo, puede incluirse una parte de cadena pesada de primate, una parte de región de bisagra o un sitio de unión en los polipéptidos objeto. Alternativamente, pueden estar presentes uno o más aminoácidos murinos en un polipéptido. Polipéptidos preferidos de la invención son no inmunogénicos.

35 Un experto habitual en la técnica también entenderá que los polipéptidos de la invención pueden alterarse de tal manera que varíen en la secuencia de aminoácidos con respecto al polipéptido que se produce de manera natural o nativo del que se derivaron, mientras que conservan la actividad deseada del polipéptido nativo. Por ejemplo, pueden realizarse sustituciones de nucleótidos o aminoácidos que conducen a sustituciones conservativas o cambios en residuos de aminoácido "no esenciales". Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para una variante no natural de un polipéptido derivado de una inmunoglobulina (por ejemplo, una parte de cadena pesada o parte de cadena ligera de inmunoglobulina) puede crearse introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la inmunoglobulina de tal manera que se introduzcan una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos en la proteína codificada. Pueden introducirse mutaciones mediante técnicas convencionales, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR.

45 Los polipéptidos de la invención pueden comprender sustituciones de aminoácidos conservativas en uno o más residuos de aminoácido no esenciales. Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que el residuo de aminoácido se sustituye por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares, incluyendo cadenas laterales básicas (lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales apolares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales con ramificación beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Así, un residuo de aminoácido no esencial en el polipéptido se sustituye preferiblemente por otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. En otra realización, puede sustituirse una serie de aminoácidos por otra serie estructuralmente similar que difiere en el orden y/o la composición de los miembros de la familia de cadenas laterales. Alternativamente, en otra realización, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de la totalidad o parte de la secuencia codificante de la inmunoglobulina, tal como mediante mutagénesis por saturación, y pueden incorporarse los mutantes resultantes a polipéptidos de la invención y examinarse para determinar su capacidad para unirse a la diana deseada. Los términos "unión específica", "unión selectiva", "se une selectivamente a", y "se une específicamente a", se refieren a la unión del anticuerpo a un epítipo en un antígeno predeterminado. Normalmente, el anticuerpo se une con una

afinidad (KD) de aproximadamente menos de 10^{-6} M, tal como aproximadamente menos de 10^{-7} M, 10^{-8} M o 10^{-9} M o incluso inferior. El término "KD" se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Normalmente, los anticuerpos de la invención se unen a su antígeno diana con una constante de equilibrio de disociación (KD) de menos de aproximadamente 10^{-6} M, tal como menos de aproximadamente 10^{-7} M, 10^{-8} M o 10^{-9} M o incluso inferior, por ejemplo, tal como se determina usando la tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIACORE.

El término "cinética de tránsito" o "farmacocinética" tal como se usa en el presente documento, se refiere a todos los factores relacionados con la dinámica de absorción del fármaco, su distribución en tejidos o líquidos corporales y su metabolismo y/o eliminación. Esto implica los factores fisicoquímicos que regulan la transferencia del polipéptido a través de membranas debido a que la absorción, distribución, biotransformación y excreción de un polipéptido implican todas el paso del polipéptido a través de membranas celulares.

Presenta un gran interés para el médico clínico la biodisponibilidad de un polipéptido. Este término, tal como se usa en el presente documento, indica la extensión con que un polipéptido alcanza su sitio de acción o un líquido biológico desde el que el polipéptido tiene acceso a su sitio de acción. Los factores que afectan a la biodisponibilidad incluyen la tasa de absorción y el metabolismo o la eliminación del polipéptido desde el sujeto. Muchos factores afectan la absorción, estos incluyen los numerosos factores fisicoquímicos que afectan el transporte a través de membranas tales como la solubilidad de un polipéptido y mecanismos de captación así como factores tales como el sitio de administración y la formulación (concentración) y composición del polipéptido. Las diversas vías de administración de polipéptidos tienen características de absorción notablemente diferentes. Estas vías incluyen ingestión oral, absorción pulmonar, inyección parenteral, incluyendo; inyección intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intratecal o intraperitoneal y aplicación tópica a las membranas mucosas, la piel o los ojos. En una realización preferida, un polipéptido de la invención para tratar una enfermedad ocular se administra de manera tópica a la superficie del ojo, por ejemplo, en forma de colirio. La cinética de tránsito de un polipéptido de la invención puede determinarse usando, por ejemplo, cualquiera de las moléculas de base celular o animal dadas a conocer en el presente documento, y se seleccionan normalmente para que sean adecuadas para el tránsito clínicamente relevante a través de las uniones estrechas de la barrera hematoencefálica, el intestino o el ojo.

El término "sujeto" se conoce en la técnica y, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un animal de sangre caliente, más preferiblemente un mamífero, incluyendo, por ejemplo, animales no humanos tales como ratas, ratones, conejos, gatos, perros, ovejas, ganado, además de seres humanos. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano. Los sujetos son aquellos susceptibles de tratamiento con un polipéptido de unión a antígeno soluble de la presente invención.

Un "agente de potenciación de la penetración" o "potenciador de la penetración" tal como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas o compuestos que fomentan el tránsito a través de una unión epitelial. Los agentes de potenciación de la penetración para su uso con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, Azone, cloruro de benzalconio (BzCl), BL-7, BL-9, Brij 35, Brij 78, Brij 98, Brij 99, polioxietileno-polioxipropileno 1800, caprato de sodio, ácido caprílico, cloruro de cetilpiridinio, clorhexidina, colato, aceite de ricino, aceite de maíz, Cremophor-EL, DMSO, bromuro de decametonio, desoxicolato, sulfato de dextrano, EDTA, edetato de disodio, etanol, fusidato, glicocolato, Laurilsulfato, L- α -lisofosfatidilcolina, N-lauroilsarcosina, NMP, ácido oleico, fosfolípidos, lauril éter de polioxietileno-9, saponina, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, taurocolato y taurodesoxicolato. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente de potenciación de la penetración es caprato de sodio. En otras realizaciones, el agente de potenciación de la penetración es clorhexidina.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo scFv que se une específicamente a un antígeno seleccionado y tiene capacidad mejorada de penetración en tejidos. Dicho anticuerpo se caracteriza porque puede obtenerse mediante un método que comprende

(i) seleccionar de una reserva de regiones de entramado solubles y estables, la región de entramado que concuerde mejor con la región de entramado con un anticuerpo no humano de una especificidad de unión a antígeno seleccionada,

(ii) o bien proporcionar a dicha región de entramado CDR que se unen a dicho antígeno o bien mutar la región de entramado de dicho anticuerpo no humano a la secuencia de dicha región de entramado soluble y estable,

(iii) someter a prueba el anticuerpo generado para determinar su solubilidad y estabilidad, y

(iv) someter a prueba el anticuerpo generado para determinar su unión a antígeno.

El término "que concuerde mejor" significa que sea lo más próxima posible con respecto a la estructura primaria o terciaria.

En general, el anticuerpo de la presente invención comprende una región de entramado con un dominio VL y/o uno VH, seleccionándose dicha región de entramado de al menos parte de un repertorio de anticuerpos humanos naturales mediante un método independiente de antígeno para una alta estabilidad y solubilidad intracelular en una célula de levadura. Dicho método también se conoce como examen de "control de calidad" de regiones de entramado de anticuerpo y ha dado como resultado una selección de regiones de entramado de anticuerpo particularmente estables y solubles que se caracterizan por una alta estabilidad y solubilidad intracelular. Estas regiones de entramado pueden usarse, por ejemplo, en un segundo sistema de examen basado en levadura para determinar la especificidad de antígeno. En este caso, las CDR de un anticuerpo particularmente estable y soluble pueden aleatorizarse y los anticuerpos resultantes pueden examinarse para determinar el mejor reconocimiento antigénico posible. Alternativamente, pueden injertarse CDR de anticuerpos conocidos con fuerte afinidad de unión a un antígeno de elección sobre dichas regiones de entramado particularmente estables y solubles. Opcionalmente, dicho anticuerpo puede mejorarse adicionalmente mediante mutagénesis de CDR y/o región/regiones de entramado seleccionada(s), seleccionando clones mejorados en el "sistema de control de calidad" (documento WO0148017, Auf der Maur *et al.* 2004), es decir, mutando dicho anticuerpo scFv mediante mutagénesis dirigida al sitio o al azar de uno o más CDR seleccionadas y/o la región de entramado y seleccionando anticuerpos estables y solubles en condiciones iguales o más rigurosas. La selección puede realizarse *in vivo* en el sistema de control de calidad de levadura.

El término "residuos de región de entramado" se refiere a residuos de aminoácido de unidades de polipéptido de unión a antígeno, o los residuos de aminoácido de polipéptido correspondientes de módulos de unión a antígeno, que contribuyen a la topología de plegamiento, es decir, que contribuyen al plegamiento de dicha unidad (o módulo) o que contribuyen a la interacción con una unidad vecina (o módulo). Tal contribución podría ser la interacción con otros residuos en la unidad (o módulo), o la influencia sobre la conformación de la estructura principal del polipéptido tal como se encuentra en hélices α o láminas β , o tramos de aminoácidos que forman bucles o polipéptidos lineales. El término "residuos de interacción con la diana" se refiere a residuos de aminoácido de las unidades, o los residuos de aminoácido correspondientes de los módulos, que contribuyen a la interacción con sustancias diana. Tal contribución podría ser la interacción directa con las sustancias diana, o la influencia sobre otros residuos que interaccionan directamente, por ejemplo, mediante la estabilización de la conformación del (poli) péptido de dicha unidad (o módulo) para permitir o potenciar la interacción de dichos residuos que interaccionan directamente con dicha diana. Tales residuos de interacción con la diana y de región de entramado pueden identificarse mediante análisis de los datos estructurales obtenidos mediante los métodos fisicoquímicos a los que se hizo referencia anteriormente, o mediante comparación con información estructural conocida y relacionada bien conocida por los profesionales de la biología estructural y/o bioinformática. Tales regiones de entramado también pueden denominarse armazones ya que proporcionan soporte para la presentación de los residuos de interacción con la diana más divergentes o CDR.

Las CDR o residuos de interacción con la diana pueden injertarse en regiones de entramado adecuadas, tales como armazones alternativos que se conocen bien en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, CTLA-4, tendamistat, fibronectina (FN3), neocarzinostatina, CBM4-2, lipocalinas, receptor de células T, dominio de proteína A (proteína Z), Im9, proteínas con repetición de anquirina diseñadas (DARPin), proteínas TPR diseñadas, dedo de zinc, pVIII, polipéptido pancreático aviar, GCN4, dominio WW, dominio 3 de homología con Src (SH3), dominio 2 de homología con Src (SH2), dominios PDZ, TEM-1 β -lactamasa, GFP, tioredoxina, nucleasa estafilocócica, dedo de PHD, CI-2, BPT1 APPI, HPSTI, ecotina, LACI-D 1, LDTI, MTI-II, toxinas de escorpión, péptido A de defensina de insectos, EETIII, Min-23, CBD, PBP, citocromo b₅₆₂, dominio A del receptor de Ldl, γ -cristalina, ubiquitina, transferina y dominio similar a lectina de tipo C (véase Binz *et al.* (octubre de 2005) Nat Biotech 23(10):1257-68), o en regiones de entramado adecuadas de polipéptidos de unión a antígeno derivados de inmunoglobulina que se conocen bien en la técnica e incluyen, pero no se limitan a dominios VhH, dominios V-NAR, dominios Vh, Fab, scFv, Bis-scFv, Ig de camello, IfNAR, IgG, Fab2, Fab3, minicuerpo, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos (véase Holliger, P. y Hudson, P. (2005), Nat. Biotechnol. 23(9), págs. 1126-1136).

Preferiblemente, el anticuerpo de la presente invención tiene una o más de las siguientes características adicionales:

- es estable en condiciones reductoras tal como se mide en un ensayo de interacción con levaduras, en el que la actividad de una proteína marcadora seleccionable fusionada a dicho scFv se correlaciona con una alta estabilidad y solubilidad de dicho scFv en un entorno intracelular. Dicho ensayo de interacción con levaduras, el denominado "control de calidad", se describió en detalle (Auf der Maur *et al.* (2001); Auf der Maur *et al.*, 2004; incorporándose las referencias en su totalidad al presente documento).

- es estable durante al menos 1 mes, preferiblemente al menos dos meses, lo más preferido al menos seis meses a de 20°C a 40°C, preferiblemente a 37°C en PBS,

- sigue siendo monomérico en condiciones fisiológicas,

- es soluble a temperatura ambiental en PBS a concentraciones de > aproximadamente 1 mg/ml, preferiblemente de

> aproximadamente 4 mg/ml, más preferiblemente de > aproximadamente 10 mg/ml, incluso más preferiblemente de > aproximadamente 25 mg/ml y lo más preferiblemente de > aproximadamente 50 mg/ml,

- revela un punto medio de transición en una valoración con clorhidrato de guanidinio de al menos 1,5 M, preferiblemente de al menos 1,75 M, más preferiblemente de al menos 1,9 M, lo más preferiblemente de al menos 2 M, es decir es resistente a la desnaturalización.

El término anticuerpo tal como se usa en el alcance de la presente invención se refiere a un anticuerpo scFv o un fragmento de anticuerpo que se une a un antígeno seleccionado. Por tanto, el anticuerpo scFv de la presente invención puede ser o bien un scFv completo que comprende un dominio VL y uno VH que se unen mediante un péptido ligador corto, por ejemplo, un ligador que comprende de 1 a 4 repeticiones de la secuencia GGGGS, preferiblemente un (GGGGS)₄-péptido (SEQ. ID. NO. 16), más preferiblemente un ligador de la secuencia GGGSGGGSGGGSSGGGS (SEQ. ID. NO: 17), o un ligador tal como se da a conocer en Alfthan *et al.* (1995) Protein Eng. 8:725-731, o simplemente un dominio VL y uno VH, que tiene suficiente capacidad de unión para el antígeno seleccionado. El ligamiento de VL y VH puede ser en cualquier orientación, VL-ligador-VH o VH-ligador-VL.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo que es estable durante al menos 1 mes, preferiblemente al menos dos meses, en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Preferiblemente dicho anticuerpo se somete a prueba para determinar la estabilidad a temperatura fisiológica, es decir, a 37°C. En otra realización preferida, dicho anticuerpo es estable durante al menos 6 meses cuando se mantiene a 4°C en PBS, o después de liofilización a temperatura ambiente. La estabilidad puede someterse a prueba, por ejemplo, analizando cantidades patrón de dichos anticuerpos mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE) seguido por un procedimiento de tinción convencional, tal como una tinción de Coomassie o tinción de plata, y comparando la intensidad de tinción de la banda de longitud completa con la de una proteína patrón. Además, se comprueba la ausencia de productos de degradación. La proteína degradada corre como una mancha, o es incluso invisible debido a lo cortos que son los productos de degradación, en cuyo caso sólo la pérdida de intensidad de la banda de proteína de longitud completa indica degradación. En general, puede suponerse una estabilidad física de un anticuerpo si no se observan signos de agregación, precipitación y/o desnaturalización tras la inspección visual del color y/o la transparencia o tal como se mide mediante dispersión de luz UV o mediante cromatografía de exclusión molecular.

La estabilidad en cuanto a la actividad después de un cierto tiempo de almacenamiento es una característica importante adicional del anticuerpo de la presente invención. Puede determinarse comparando la potencia del anticuerpo antes y después del almacenamiento, por ejemplo, en ensayos de unión a diana *in vitro* usando ELISA o en ensayos de actividad celular *in vivo* en los que se mide la potencia de inhibición del anticuerpo.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo que es y sigue siendo monomérico en condiciones fisiológicas, tal como puede evaluarse, por ejemplo, mediante filtración en gel. El estado monomérico es una característica importante de anticuerpos que pueden penetrar a través de barreras epiteliales.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un anticuerpo, que es soluble a temperatura ambiental en PBS a concentraciones mayores de aproximadamente 1 mg/ml, preferiblemente mayores de aproximadamente 4 mg/ml, lo más preferiblemente de aproximadamente 10 mg/ml. La solubilidad del anticuerpo purificado puede determinarse mediante precipitación con PEG usando PEG3000, o mediante cromatografía de autointeracción (SIC).

En aún otro aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo, que revela un punto medio de transición en una valoración con clorhidrato de guanidinio de al menos aproximadamente 1,5 M, preferiblemente de al menos aproximadamente 1,75 M, más preferiblemente de al menos aproximadamente 1,9 M, lo más preferiblemente de al menos aproximadamente 2 M. Esto es una medida para la estabilidad en el sentido de resistencia frente al desplegamiento, mediante lo cual el desplegamiento/desnaturalización inducidos mediante la adición de guanidinio va seguido por espectroscopía de discoísmo celular o fluorescencia.

En la presente invención, el anticuerpo que tiene una o más de características biofísicas mencionadas anteriormente se caracteriza estructuralmente por una región de entramado del dominio variable de cadena ligera (VL) de una similitud de al menos el 85%, preferiblemente una similitud de al menos aproximadamente el 95%, lo más preferiblemente una identidad de al menos el 98% con una región de entramado de VL seleccionada del grupo que comprende SEQ. ID. NO. 1 (de tipo kappa1), SEQ. ID. NO. 2 (de tipo kappa1), SEQ. ID. NO. 3 (de tipo kappa3) o SEQ. ID. NO. 4 (de tipo lambda1), SEQ. ID. NO. 5 (de tipo kappa3), SEQ. ID. NO. 6 (de tipo lambda3) o SEQ. ID. NO. 7 (de tipo lambda3) y/o una región de entramado del dominio variable de cadena pesada (VH) de una similitud de al menos el 85%, preferiblemente una similitud de al menos aproximadamente el 95%, lo más preferido una identidad de al menos el 98% con una región de entramado de VH seleccionada del grupo que comprende SEQ. ID. NO. 8 (de tipo H3, SEQ. ID. NO:9 (de tipo H3), SEQ. ID. NO. 10 (de tipo H1b), o SEQ. ID. NO. 11 (de tipo H3). En una realización preferida, se usa la combinación entre homólogos de VL de SEQ. ID. NO:2 y homólogos de VH de SEQ. ID. NO:8, combinación entre homólogos de VL de SEQ. ID. NO:4 y homólogos de VH de SEQ. ID. NO: 10, o combinaciones entre homólogos de una cualquiera de las secuencias de VL mencionadas anteriormente, un

homólogo de VH de SEQ. ID. NO:9. Se prefieren más anticuerpos con una similitud de > el > 90%, e incluso más preferido con una similitud de > el > 95% de SEQ. ID. NO. 7. Lo más preferido son anticuerpos de la secuencia SEQ. ID. NO:7 y/o SEQ. ID. NO:8. También se entiende que la invención engloba una cualquiera de las secuencias de VL dadas a conocer en combinación con una cualquiera de las secuencias de VH dadas a conocer siempre que se mantenga la especificidad de unión a la diana.

El porcentaje de similitud entre dos secuencias es una medida de la extensión en que la están relacionadas secuencias proteicas. La extensión de la similitud entre dos secuencias puede basarse en el tanto por ciento de identidad y/o conservación de secuencia. La conservación se refiere a cambios en una posición específica de una secuencia de aminoácidos que conserva las propiedades fisicoquímicas del residuo original. La similitud entre secuencias se determina normalmente mediante alineación de secuencias.

Las similitudes a las que se hace referencia en el presente documento han de determinarse usando los programas BLAST (Basic Local Alignment Search Tools (herramientas de búsqueda de alineación local básica); véase Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool". J. Mol. Biol. 215:403-410) accesible en Internet. Las búsquedas de proteínas mediante BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos similares a las de las moléculas de proteína de la invención. Para obtener alineaciones con huecos para fines de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST tal como se describe en Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). El tanto por ciento de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del tanto por ciento de identidad entre dos secuencias puede lograrse usando un algoritmo matemático, lo que conocen bien los expertos en la técnica.

El tanto por ciento de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el programa GAP en el paquete de software GCG, usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. También puede determinarse el tanto por ciento de identidad usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 4.11-17 (1989) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuos con peso PAM129, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el tanto por ciento de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. (48): 444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG, usando o bien una matriz Blossum 62 o bien una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ó 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

En otro aspecto, el anticuerpo de la presente invención se modifica químicamente. Las modificaciones químicas pueden cambiar propiedades del anticuerpo tales como estabilidad, solubilidad, especificidad o afinidad de unión a antígeno, citotoxicidad de semivida *in vivo* y capacidad de penetración en tejidos. Las modificaciones químicas las conoce bien el experto. Una modificación química preferida del anticuerpo de la presente invención es pegilación.

En otro aspecto preferido, la afinidad del anticuerpo de la presente invención se caracteriza por una constante de disociación Kd de menos de aproximadamente 100 nM, preferiblemente menos de aproximadamente 10 nM, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 1 nM. Se determinan parámetros de unión tales como afinidad del anticuerpo con su antígeno relacionado mediante resonancia de plasmón superficial (BiaCore) o ELISA. Estos métodos se conocen bien en la técnica.

Preferiblemente, el antígeno al que se une el anticuerpo de la presente invención es TNF α (factor de necrosis tumoral alfa). TNF α , también conocida como caectina, es una citocina de mamíferos que se produce de manera natural producida por numerosos tipos de células, incluyendo monocitos y macrófagos en respuesta a endotoxina u otros estímulos. TNF α es un mediador importante de reacciones inflamatorias, inmunológicas y fisiopatológicas (Grell, M., *et al.* (1995) Cell, 83: 793-802). Un gran número de trastornos están asociados con niveles elevados de TNF α , muchos de ellos de importancia médica significativa. Se ha mostrado que TNF α está regulado por incremento en varias enfermedades humanas, incluyendo enfermedades crónicas tales como artritis reumatoide (AR), trastornos inflamatorios del intestino incluyendo enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, septicemia, insuficiencia cardiaca congestiva, asma bronquial y esclerosis múltiple. TNF α también se denomina citocina proinflamatoria. Sin embargo, también está implicada en trastornos con una manifestación local, tales como enfermedades oculares, por ejemplo, degeneración macular, uveítis, glaucoma, cataratas, retinitis, síndrome de ojo seco, escleritis, conjuntivitis y queratitis. El anticuerpo de la presente invención es particularmente adecuado para el tratamiento de tales enfermedades, ya que puede aplicarse localmente y de manera tópica, por ejemplo, para enfermedades oculares mediante colirio.

También se describe en el presente documento una secuencia de ADN que codifica para el anticuerpo de la presente invención, así como un vector de expresión o clonación que contiene dicha secuencia de ADN. Además, se

da a conocer en el presente documento una célula huésped adecuada transformada con dicha secuencia de ADN. Esta puede ser una célula procariota o eucariota, en particular una célula de *E. coli*, de levadura, vegetal, de insecto o de mamífero.

5 El anticuerpo de la presente invención puede generarse usando técnicas de rutina en el campo de la genética recombinante. Conociendo las secuencias de los polipéptidos, pueden generarse los ADNs que codifican para las mismas mediante síntesis génica.

Además, se da a conocer en el presente documento un método para la producción del anticuerpo de la presente invención, que comprende cultivar la célula huésped transformada con el ADN que codifica para dicho anticuerpo en condiciones que permiten la síntesis de dicho anticuerpo, y recuperar dicha molécula de dicho cultivo.
10 Preferiblemente, dicho método proporciona un anticuerpo scFv purificado a partir de cuerpos de inclusión de *E. coli* o del periplasma de *E. coli*, si el constructo de scFv usado comprende una secuencia señal que dirige el polipéptido al periplasma.

Se da a conocer en el presente documento el uso del anticuerpo de la presente invención como herramienta para el diagnóstico, preferiblemente diagnóstico *in vitro*, y/o como producto farmacéutico. Este uso se prefiere particularmente en el contexto de cualquier estado relacionado con TNF α . La enfermedad que va a tratarse con un scFv anti-TNF α o fragmento del mismo es preferiblemente una enfermedad relacionada con la sobreexpresión de TNF α . Si la sobreexpresión de TNF α conduce a una función celular anómala, un anticuerpo que puede unirse y, por tanto, neutralizar TNF α en exceso, es un producto farmacéutico ideal para el tratamiento de tal enfermedad, si dicho anticuerpo puede alcanzar el lugar de exceso de TNF α . Si este lugar está dentro de la célula, el anticuerpo debe poder entrar en la célula. Si este lugar es extracelular, el anticuerpo debe poder alcanzar la matriz extracelular en un tejido, es decir, atravesar al menos la capa de células más externa de un tejido, que es habitualmente la capa de células epiteliales. En otra realización de la presente invención el anticuerpo puede penetrar el endotelio.

IV. Composiciones farmacéuticas y administración farmacéutica

A. *Composiciones y administración*

25 En la mayoría de los casos, el anticuerpo de la presente invención se usará en una composición farmacéutica, comprendiendo dicha composición farmacéutica al menos un compuesto adicional. Preferiblemente, este estará en combinación con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. El excipiente puede seleccionarse del grupo que comprende Azone, cloruro de benzalconio (BzCl), BL-7, BL-9, Brij 35, Brij 78, Brij 98, Brij 99, polioxietileno-polioxipropileno 1800, caprato de sodio, ácido caprílico, cloruro de cetilpiridinio, clorhexidina, colato, aceite de ricino, aceite de maíz, Cremophor-EL, DMSO, bromuro de decametonio, desoxicolato, sulfato de dextrano, EDTA, edetato de disodio, etanol, fusidato, glicocolato, laurilsulfato, L- α -lisofosfatidilcolina, N-lauroilsarcosina, NMP, ácido oleico, fosfolípidos, lauril éter de polioxietileno-9, saponina, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, taurocolato, taurodesoxicolato, péptidos de apertura de unión estrecha y derivados de péptido, proteínas de apertura de unión estrecha y derivados de proteína. Preferiblemente, el excipiente se selecciona del grupo que comprende cloruro de benzalconio, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 y clorhexidina. También es posible usar caprato. Tales sustancias pueden funcionar como potenciadores de la penetración.

En la mayoría de los casos, la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la presente invención se aplicará localmente en vez de sistémicamente. El anticuerpo de la presente invención es particularmente adecuado para aplicación local, ya que su formato de scFv es pequeño, y su región de entramado tiene características fisicoquímicas que le permiten penetrar barreras de tejido epitelial. Un aplicación local es una aplicación en una zona relativamente restringida tal como el ojo, la cavidad nasal, la cavidad oral, el tracto intestinal, la piel, la mucosa de la boca y el tracto urogenital, articulaciones y espacios articulares, el cerebro, las vértebras, etc., en las que la aplicación de un volumen relativamente pequeño de anticuerpo suficientemente concentrado es eficaz. Por otro lado, la aplicación tópica es una aplicación a la superficie de una parte del cuerpo.

45 La forma preferida de administración de la composición farmacéutica de la presente invención es mediante aplicación tópica; sin embargo, otras formas son mediante inhalación, por ejemplo, si se desea que el anticuerpo esté destinado a penetrar el epitelio del pulmón. La administración pulmonar puede lograrse usando un inhalador o nebulizador y una formulación que comprende un agente de aerosolización.

Para aplicaciones tópicas, el lugar preferido es el ojo. El anticuerpo de la presente invención es particularmente adecuado para penetrar la córnea, que consiste principalmente en tres capas de tejido, concretamente el epitelio, el estroma y el endotelio. Por tanto, el anticuerpo puede usarse para el tratamiento de muchas enfermedades del ojo.

B. Sistemas de administración de fármacos

Los ejemplos no limitativos de sistemas de administración de fármacos oculares tópicos para su uso en la invención

incluyen potenciadores de la penetración, escudos de colágeno corneales, iontoforesis ocular, micropartículas o nanopartículas, insertos oculares, polímeros mucoadhesivos, sistema de gelificación *in situ*, dendrímeros, emulsiones lipídicas e insertos oculares (véase Sultana, *et al.* (2007) *Future Drugs*, 2(2), 309-323 (2007)).

i. i. Potenciadores de la penetración

5 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir un potenciador de la penetración. Se conocen bien en la técnica ejemplos de potenciadores de la penetración, e incluyen Azone®, cloruro de benzalconio (BzCl), BL-7, BL-9, Brij 35, Brij 78, Brij 98, Brij 99, polioxietileno-polioxipropileno 1800, caprato de sodio, ácido caprílico, cloruro de cetilpiridinio, clorhexidina, colato, aceite de ricino, aceite de maíz, Cremophor-EL, ciclodextrinas, DMSO, bromuro de dexametono, desoxicolato, sulfato de dextrano, EDTA, edetato de disodio, etanol, fusidato, glicocolato, laurilsulfato, L- α -lisofosfatidilcolina, metazolamida, N-lauroilsarcosina, NMP, ácido oleico, péptido Pz, fosfolípidos, lauril éter de polioxietileno-9, saponina, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, taurocolato y taurodesoxicolato (véase Sultana, *et al.* (2007) *Future Drugs*, 2(2), 309-323 (2007)). En otra realización, el potenciador de la penetración es caprato de sodio. En aún otra realización, el potenciador de la penetración incluye sistemas coloidales, poliacrilatos y polímero bioadhesivo. Véase también el documento U.S.S.N. 60/____ (expediente del apoderado n.º ES5-016-1
10 15 titulado "Improved penetration Enhancers for the Delivery of Therapeutic Proteins" presentado el 10 de julio de 2007).

ii. Escudos de colágeno corneales

Los anticuerpos de la invención también pueden administrarse con un escudo de colágeno corneal. En algunas realizaciones, pueden usarse escudos de colágeno con tiempos de disolución de 12, 24 y 72 horas. En otras
20 realizaciones, el escudo de colágeno se empapa previamente en disoluciones de gatifloxacino y/o moxifloxacino.

iii. Iontoforesis ocular

Los anticuerpos de la invención también pueden administrarse mediante iontoforesis ocular. En una realización, los anticuerpos pueden administrarse al segmento anterior del ojo mediante iontoforesis transcorneal. En otra
25 realización, las concentraciones altas y sostenidas de los anticuerpos de la invención pueden administrarse al humor vítreo y la retina mediante iontoforesis transescleral. La iontoforesis se aplica durante la duración de tiempo deseada. En algunas realizaciones, la iontoforesis se aplica de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 minutos. En otras realizaciones, la iontoforesis se aplica menos de 1 minuto. En otra realización, la iontoforesis se aplica durante más de 4 minutos.

iv. Micropartículas y nanopartículas

30 Los anticuerpos de la invención también pueden administrarse usando sistemas de administración microparticulados o nanoparticulados. En algunas realizaciones, la micropartícula es una microcápsula. En otras realizaciones, la micropartícula es una microesfera. En realizaciones adicionales, el material microparticulado comprende polímeros que son erosionables, biodegradables, no erosionables o resinas de intercambio iónico. En otra realización, el sistema de administración microparticulado es Betoptic S®, que contiene betaxolol al 0,25%.

35 También pueden usarse nanopartículas, partículas más pequeñas de 1 μm . En una realización, la nanopartícula es una nanocápsula. En otra realización, la nanopartícula es una nanoesfera. En una realización, la nanopartícula comprende poliacrilcianoacrilato (PACA). En otra realización, la nanopartícula comprende poli- α -caprolactona. En determinadas realizaciones, la nanopartícula comprende nanopartículas lipídicas sólidas que contienen tobramicina al 2,5% con fosfato de hexadecilo. En otra realización, la nanopartícula comprende Eudragit RS 100 o Eudragit RL
40 100 y opcionalmente comprende además cloricromeno. En realizaciones adicionales, la nanopartícula incluye nanosuspensiones de polímero de acrilato cargado con flurbiprofeno (FB).

v. Insertos oculares

Los anticuerpos de la invención también pueden administrarse usando insertos oculares. En algunas realizaciones, los insertos oculares son insertos insolubles, solubles o bioerosionables. Los insertos insolubles incluyen sistemas
45 de difusión, sistemas osmóticos y lentes de contacto hidrófilas. Los insertos solubles pueden componerse de polímeros naturales, sintéticos o semisintéticos. Los insertos bioerosionables pueden componerse de polímeros bioerosionables.

vi. Polímeros mucoadhesivos

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir polímeros mucoadhesivos. Se conocen bien en la técnica ejemplos de polímeros mucoadhesivos, e incluyen quitosano (CS), Ch-HCL y N-carboximetilquitosano (CMCh), polímeros de N-trimetilquitosano (TMC), CS/Carbopol® cargado con pilocarpina, poli(ácido acrílico) (PAA),
50

polisacáridos, xiloglucano, polisacárido de semilla de tamarindo (TSP) y polímeros o tiómeros tiolados.

vii. Sistemas de gelificación in situ

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir sistemas de gelificación in situ. Se conocen bien en la técnica ejemplos de sistemas de gelificación in situ, e incluyen sistemas de gelificación in situ mediados por pH, sistemas de gelificación in situ mediados por temperatura y sistemas de gelificación in situ mediados por iones. Los sistemas de gelificación in situ mediados por pH pueden incluir, por ejemplo, polímeros tales como acetato-ftalato de celulosa (CAP) y Carbopol®. Los sistemas de gelificación in situ mediados por temperatura pueden incluir, por ejemplo, compuestos plurónicos, tetraónicos y etilhidroxietilcelulosa. Los sistemas de gelificación in situ también pueden incluir Gelrite® (goma gellas desacetilada (DCG)), alginatos, por ejemplo, alginato-poli(L-Lisina), disoluciones oftálmicas de maleato de timolol, por ejemplo, Timoptol XE y Lizmon TG®, y combinaciones de los mismos.

viii. Dendrímeros

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir dendrímeros. Se conocen bien en la técnica ejemplos de dendrímeros, e incluyen TM poliamidoamina (PAMAM).

15 C. Formulaciones

En otra realización, la formulación puede ser una formulación de liberación lenta, prolongada o en el tiempo, una formulación portadora tal como microesferas, microcápsulas, liposomas, etc., tal como conoce un experto en la técnica. Cualquiera de los sistemas de administración mencionado anteriormente puede administrarse de manera tópica, por vía intraocular, por vía subconjuntival, o mediante implante para dar como resultado la liberación sostenida del agente a lo largo de un periodo de tiempo. La formulación puede ser en forma de un vehículo, tal como una micro o macrocápsula o matriz de polímeros biocompatibles tales como policaprolactona, poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico), polianhídridos, polilactida-co-glicolidas, poliaminoácidos, poli(óxido de etileno), poli(óxido de etileno) terminado en acrílico, poliamidas, polietilenos, poliacrilonitrilos, polifosfacenos, poli(ortoésteres), acetato-isobutirato de sacarosa (SAIB), y otros polímeros tales como los dados a conocer en las patentes estadounidenses n.ºs 6.667.371; 6.613.355; 6.596.296; 6.413.536; 5.968.543; 4.079.038; 4.093.709; 4.131.648; 4.138.344; 4.180.646; 4.304.767; 4.946.931, o lípidos que puede formularse como microesferas o liposomas. Una formulación microscópica o macroscópica puede administrarse de manera tópica o a través de una aguja, o puede implantarse. Pueden proporcionarse propiedades de liberación retardada o prolongada a través de diversas formulaciones del vehículo (microesfera recubierta o no recubierta, cápsula recubierta o no recubierta, componentes lipídicos o de polímero, estructura unilamelar o multilamelar, y combinaciones de los anteriores, etc.). La formulación y carga de microesferas, microcápsulas, liposomas, etc. y su implantación ocular son técnicas convencionales conocidas por un experto en la técnica, por ejemplo, el uso de un implante de liberación sostenida de ganciclovir para tratar retinitis por citomegalovirus, dado a conocer en *Vitreoretinal Surgical Techniques*, Peyman *et al.*, Eds. (Martin Dunitz, Londres 2001, capítulo 45); *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*, Wise, Ed. (Marcel Dekker, Nueva York 2000). Por ejemplo, puede insertarse un implante intraocular de liberación sostenida a través de la pars plana para su implantación en la cavidad vítrea. Una inyección intraocular puede ser en el humor vítreo (intravítrea), o bajo la conjuntiva (subconjuntival), o detrás del ojo (retrobulbar), o bajo la cápsula de Tenon (subtenónica), y puede ser en una forma de depósito. La composición puede administrarse por medio de una lente de contacto aplicada a la superficie exterior de un ojo, con la composición incorporada en el material de la lente (por ejemplo, en la fabricación, o contenida en una disolución de la lente). La composición puede administrarse por medio de una lente intraocular (IOL) que se implanta en el ojo. Las lentes implantables incluyen cualquier IOL usada para reemplazar el cristalino enfermo de un paciente tras la cirugía de cataratas, incluyendo pero sin limitarse a las fabricadas por Bausch and Lomb (Rochester N.Y.), Alcon (Fort Worth Tex.), Allergan (Irvine Calif.), y Advanced Medical Optics (Santa Ana Calif.). Véase también Degim, I.T y Celebi, N. (2007), *Current Pharmaceutical Design*, 13, 99-117]. Cuando la lente se implanta dentro de la cápsula de la lente, la composición proporciona el efecto deseado al ojo. Las concentraciones adecuadas para implantes (lentes y otros tipos) y mediante administración con lentes de contacto pueden variar, tal como apreciará un experto en la técnica. Por ejemplo, un implante puede cargarse con una alta cantidad de agente, pero se formula o se regula de modo que se libere de manera sostenida una concentración requerida dentro de los intervalos descritos anteriormente (por ejemplo, formulación de liberación lenta).

Se ha hallado que las concentraciones de anticuerpo logradas normalmente con los scFv en el intervalo de hasta 1 mg/ml no son bastante eficaces en la penetración epitelial a menos que se añadan potenciadores de la penetración (documento WO0040262). La presente invención se refiere a anticuerpos que son altamente solubles, de modo que pueden prepararse y usarse composiciones farmacéuticas que comprenden dicho anticuerpo a concentraciones superiores, es decir mayores de aproximadamente 2 mg/ml, preferiblemente mayores de aproximadamente 5 mg/ml, lo más preferiblemente mayores de aproximadamente 10 mg/ml en el tratamiento eficaz de la correspondiente enfermedad relacionada con antígeno.

Así, se describe en el presente documento el tratamiento de una enfermedad relacionada con antígeno, en la que la administración del anticuerpo al sitio de interacción antígeno-anticuerpo requiere penetración en un tejido que comprende uniones estrechas, en particular un epitelio y/o un endotelio. Un epitelio es un tejido compuesto por una capa de células, y reviste tanto el exterior (piel) y como el interior (por ejemplo intestino) de los organismos. Los epitelios también incluyen las membranas mucosas que revisten el interior de la boca y cavidades corporales y comprenden células epiteliales escamosas muertas, y células epiteliales que revisten el interior de los pulmones, el tracto gastrointestinal, y los tractos reproductor y urinario. Un endotelio es una capa de células finas, planas que reviste la superficie interior de vasos sanguíneos y órganos. En la vasculatura forma una superficie de contacto entre la sangre circulante en la luz y el resto de la pared del vaso. Las células endoteliales revisten todo el sistema circulatorio, desde el corazón hasta el capilar más pequeño. En vasos sanguíneos pequeños y capilares, las células endoteliales son a menudo el único tipo de célula presente. Las células endoteliales también controlan el paso de materiales dentro y fuera del torrente sanguíneo. En algunos órganos, hay células endoteliales altamente diferenciadas para realizar funciones de "filtración" especializadas. Los ejemplos de tales estructuras endoteliales únicas incluyen el glomérulo renal y la barrera hematoencefálica. El tejido endotelial es un tipo especializado de tejido epitelial.

El anticuerpo de la presente invención logra la penetración en la córnea. El epitelio corneal cubre la parte frontal de la córnea y consiste en varias capas de células, que hacen que la penetración por un anticuerpo sea incluso más difícil. El anticuerpo de la presente invención puede penetrar toda la córnea.

Un fármaco ideal para el tratamiento de uveítis debe cubrir cuatro características cruciales: 1) Proporcionar un comienzo rápido de los efectos sobre síntomas agudos. 2) Mostrar una eficacia comparable en comparación con corticosteroides tópicos convencionales. 3) Mostrar un perfil de seguridad superior en comparación con corticosteroides tópicos convencionales. 4) Tener propiedades farmacocinéticas favorables que permiten la aplicación tópica a la córnea así como la inyección intravítrea en comparación con corticosteroides convencionales o anticuerpos monoclonales convencionales.

Un inhibidor de TNF α aplicado localmente, que comprende propiedades farmacocinéticas adecuadas, puede abordar todos estos aspectos. La buena penetración del anticuerpo anti-TNF α scFv ESBA105 dentro de la parte anterior del ojo combinada con su alta actividad neutralizante de TNF α conduce en última instancia a concentraciones intraoculares que son muy adecuadas para lograr eficacia terapéutica para uveítis anterior. Teniendo en cuenta que los niveles de TNF α hallado en el ojo enfermo eran de 15 pg/ml y que las concentraciones de ESBA105 medidas eran de hasta 40.000 ng/ml para la parte anterior (véase la figura 7) y de hasta 125 ng/ml para la parte vítrea del ojo (véase la figura 8), se concluye que ESBA105 no sólo es adecuado para el tratamiento de uveítis anterior, sino también para el tratamiento de diferentes formas de panuveítis como por ejemplo la enfermedad de Behçet ocular. La presente invención se refiere por tanto a un anticuerpo para el tratamiento de trastornos oculares mediante aplicación tópica al ojo, en particular para el tratamiento de cualquier forma de uveítis, enfermedad de Behçet, retinitis, síndrome de ojo seco, glaucoma, síndrome de Sjögren, diabetes mellitus (incl. neuropatía diabética), escleritis, conjuntivitis y queratitis. La administración se produce preferiblemente mediante colirio, pomada ocular, o a partir de dispositivos de depósito como lentes de contacto).

En otro aspecto, el anticuerpo de la presente invención debe penetrar el epitelio intestinal.

En el caso de tratamiento en el pulmón, debe usarse inhalación para aplicar el anticuerpo de la presente invención al epitelio del pulmón.

En aún otro aspecto, el anticuerpo se usa como herramienta de diagnóstico.

Las secuencias de la presente invención son las siguientes:

SEQ.ID. No:1 VL del tipo kappa1

**EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKA
SSLESGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQQYKSYWTFGQGTKLTVL
G**

45 SEQ. ID. NO:2 VL del tipo kappa1

EIVLTQSPSSLSASVGDRVLTLCRASQGIRNELAWYQQRPGKAPKRLIYA
GSILQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDVAVYYCQQYYSPLPYMFGQGTKVD
IKR

SEQ. ID. NO:3 VL del tipo kappa3

EIVMTQSPATLSVSPGESAAALSCRASQGVSTNVAWYQQKPGQAPRLLIY
GATTRASGVPARFSGSGSGTEFTLTINSLQSEDFAAYYCQQYKHWPPWTFGQGT
KVEIKR

SEQ. ID. NO:4 VL del tipo kappa3

5 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTLTHYLAWYQQKPGQAPRLLIYD
TSKRATGTPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDSALYYCQQRNSWPHTFGGGTKLE
IKR

SEQ. ID. NO:5 VL del tipo lambda1

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSTSNIGDNYVSWYQQLPGTAPQLLIY
DNTKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLGTVVFGGG
TKLTVLG

SEQ. ID. NO:6 VL del tipo lambda 3

SYVLTQPPSVSVAPGQTATVTCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVY
DDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIRRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHNVFGSG
TKVEIKR

10 SEQ. ID. NO:7 VL del tipo lambda 3

LPVLTQPPSVSVAPGQTARISCGGNNIETISVHWYQQKPGQAPVLVVSDD
SVRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDYVFGGGTK
LTVLG

SEQ. ID. NO:8 VH del tipo H1b

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGYSFTGYFLHWVRQAPGQGLEW
MGRINPDSGDTIYAQKFQDRVLTTRDTSIGTVYMELTSLSDDTAVYYCARVPR
GTYLDPWDYFDYWGQGLVTVSS

SEQ. ID. NO:9 VH del tipo H3

15 QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV
SAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAHVLR
FLEWLPDAFDIWGQGLVTVSS

SEQ. ID. NO: 10 VH del tipo H3

EVQLVESGGGVAQPGGSLRVSCAASGFSFSSYAMQWVRQAPGKGLEWV
AVISNDGRIEHYADAVRGRFTISRDN SQNTVFLQMNSLRSDDTALYYCAREIGA
TGYLDN WGQGT LVTVSS

SEQ. ID. NO:11 VH del tipo H3

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV
SAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDAGI
AVAGTCFDYWGQGT LVTVSS

SEQ. ID. NO: 12 TB-A

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPKLLIY
SAFNRYTGVPSRFSGRGYGTDFTLTISLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTK
LEVKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGY
TFTHYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRFTFSLETSASTV
5 YMELTSLSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGT LVTVSS

SEQ. ID. NO: 13 ESBA105

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPKLLIY
SAFNRYTGVPSRFSGRGYGTDFTLTISLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTK
LEVKRGGGGSGGGGSGGGGSSGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGY
TFTHYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRFTFSLETSASTV
YMELTSLSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGT LVTVSS

SEQ. ID. NO: 14 TB-WT

DIVMTQTPKFLLSAGDRVTTITCTASQSVSNDVVWYQQKPGQSPKMLM
YSAFNRYTGVDPDRFTGRGYGTDFTFTISSVQAEDLAVYFCQQDYNSPRTFGGGT
KLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSSGGGSQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYT

FTHYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKEHFAFSLETSASTVF
10 LQINNLKNEDTATYFCARERGDAMDYWGQGT SVTVSS

SEQ. ID. NO: 15 scFv Lucentis

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFT
SSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIK
RGGGGSGGGGSGGGGSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHY
GMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMN
SLRAEDTAVYYCAKYPYYTSSHWYFDVWGQGT LVTVSS

SEQ. ID. NO:16 ligador

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

SEQ. ID. NO:17 ligador

GGGGSGGGGSGGGGSSGGGS

SEQ. ID. NO: 18 ESBA105-QC15.2

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPKLLIY
SAFNRYTGVPSRFSGRGYGTDFTLTISLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTK
LEVKRGGGGSGGGGSGGGGSSGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVVSCTASGY
TFTHYGMNWVRQAPGRGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRITFSLETSASTVY
MELTSLTSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGTLLVTVSS

5 SEQ. ID. NO: 19 ESBA105-H_F68A

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPKLLIY
SAFNRYTGVPSRFSGRGYGTDFTLTISLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTK
LEVKRGGGGSGGGGSGGGGSSGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVVSCTASGY
TFTHYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRATFSLETSASTV
YMELTSLTSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGTLLVTVSS

SEQ. ID. NO:20 TB-H_F68V_F70L

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPKLLIY
SAFNRYTGVPSRFSGRGYGTDFTLTISLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTK
LEVKRGGGGSGGGGSGGGGSSGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVVSCTASGY
TFTHYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRVTLTSLTASTV
YMELTSLTSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGTLLVTVSS

SEQ ID ID No:21 TB-H_F70L

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPKLLIY
SAFNRYTGVPSRFSGRGYGTDFTLTISLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTK
LEVKRGGGGSGGGGSGGGGSSGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVVSCTASGY
TFTHYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRFTLSLETSASTV
10 YMELTSLTSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGTLLVTVSS

Ejemplos

A lo largo de todos los ejemplos, se usaron los siguientes materiales y métodos a menos que se establezca otra cosa.

Materiales y métodos

- 15 En general, la práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de química, biología molecular, tecnología de ADN recombinante, inmunología (especialmente, por ejemplo, tecnología de inmunoglobulinas) y cría de animales. Véanse, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989); *Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology)*, 510, Paul, S., Humana Pr (1996); *Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169)*, McCafferdad, Ed., Irl Pr (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow *et al.*, C.S.H.L. Press, Pub. (1999);
20 *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons (1992).

Ejemplo 1: Producción de los scFv

Se produjeron anticuerpos scFv por medio de expresión como cuerpos de inclusión, seguido por una etapa de replegamiento y una de cromatografía. Se produjeron tres anticuerpos de cadena sencilla. Esto incluye dos scFv convencionales, que presumiblemente no cumplen los criterios de ser muy solubles, particularmente estables y monoméricos. Uno de ellos es TB-wt (SEQ. ID. NO: 14), que se construyó mediante la unión de las secuencias VL y VH naturales del anticuerpo monoclonal murino anti-TNF α Di62 (Doring *et al.*, 1994). El otro es scFv de Lucentis, que se construyó mediante la unión de las secuencias VL y VH del fragmento Fab específico de VEGF ranibizumab (SEQ. ID. NO: 15). ESBA105 es un scFv, que porta las CDR de Di62 y que revela un valor de kD en el intervalo nanomolar para TNF α . Se caracterizaron la solubilidad, estabilidad y comportamiento monomérico de ESBA105 empleando una región de entramado de scFv, que se seleccionó mediante el denominado sistema de control de calidad (Auf der Maur *et al.*, 2004). La secuencia de aminoácidos de ESBA105 se da a conocer en SEQ. ID. NO. 13.

La figura 1 muestra los perfiles de elución de ESBA105 (A), TB-wt (B) y scFv de Lucentis (C) de la filtración en gel preparativa, que sigue a la etapa de replegamiento. Mientras que el perfil para ESBA105 consiste principalmente en un pico marcado que va hasta 300 mUA (unidades relativas para la absorción), pueden observarse varios picos anchos con alturas máximas de 16 y 55 mUA, respectivamente, en los perfiles de TB-wt y scFv de Lucentis. Esto indica que o bien la calidad de los cuerpos de inclusión y o el proceso de replegamiento es mucho menos eficaz para TB-wt y scFv de Lucentis en comparación con ESBA105.

A continuación, se describe el procedimiento de producción en detalle para ESBA105.

Construcción del plásmido pGMP002 para la expresión de ESBA105:

Se ligó la secuencia codificante de ESBA105 en los sitios NcoI - HindIII de pET-24d(+) (Novagen, número de catálogo 69752-3). Posteriormente, se eliminó el fragmento de Bpu1102I - NotI del constructo resultante mediante ligación de extremos romos después de que se rellenaran los extremos cohesivos producidos mediante digestiones con Bpu1102I y NotI mediante reacción con polimerasa de T4 para producir pGMP003. Se produjo pGMP002 mediante la eliminación de Bpu1102I - NotI de pET-24d(+) directamente.

Expresión de ESBA105 en *E. coli*:

Para la expresión de ESBA105, se transformó *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) con el plásmido de expresión pGMP002. Se prepararon cultivos de reserva en glicerol a partir de colonias individuales, se cultivaron en medio M9 (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A laboratory Manual) que contiene glucosa al 1%, 1 ml/l de una disolución de oligoelementos (Wang y Lee, Biotechnol Bioeng 58:325-328) y kanamicina 50 μ g/ml. Se hicieron crecer las células durante la noche a 37°C, se añadió glicerol hasta el 20% y se almacenaron alícuotas de 1 ml como reservas en glicerol a -80°C.

Para el primer precultivo, se inocularon 50 ml de un medio definido sintético (Korz *et al.*, J. Biotechnol. 1995, 39:59-65), que contiene glucosa al 1%, 1 ml/l de disolución de oligoelementos y kanamicina 50 μ g/ml, con 1 ml de una reserva en glicerol. Se hizo crecer el precultivo durante la noche a 37°C y 200 rpm en un matraz de agitación con deflectores. Se inoculó un segundo precultivo con 250 ml del mismo medio con el primer precultivo y se hizo crecer durante tres horas adicionales a 37°C.

Se realizaron cultivos en biorreactor en un biorreactor de 5 l (BioFlo 110, New Brunswick Scientific), que contenía un volumen inicial de 3 l del mismo medio sintético usado para los precultivos. Se fijó la temperatura de cultivo a 37°C. Se controló el pH del cultivo a 7,0 mediante la adición de agua amoniacal al 25% y ácido fosfórico 1 M. El nivel de oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 20% del nivel de saturación del aire variando el porcentaje de oxígeno puro a una velocidad de aireación global de 4 l/min. Se inoculó el biorreactor con el segundo precultivo y se hizo funcionar en modo discontinuo hasta una DO₆₀₀ de 10-12. Entonces se inició la alimentación con glucosa exponencial a una velocidad de 0,15 h⁻¹ con una disolución de glucosa al 50% que contenía MgSO₄·7H₂O 10 g/l y disolución de oligoelementos 5 ml/l. Después de 16 h, se indujo la expresión de proteínas mediante la adición de IPTG hasta 1 mM y se continuó la alimentación exponencial durante 3 h. Entonces se recogieron las células mediante centrifugación a 4.600 rpm durante 1 h.

Preparación de cuerpos de inclusión:

Para la preparación de cuerpos de inclusión, se resuspendió 1 kg de pasta celular húmeda en 5 l de tampón TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,3). Se añadió 1 g de lisozima sólida y se incubó la suspensión celular durante 30-60 min. Para la rotura de las células, se hizo pasar la suspensión dos veces al través de un homogeneizador de alta presión (Niro Soavi, Panda 2K) a 1.000 bar. Se centrifugaron las células rotas durante 1 h a 4600 rpm y se resuspendieron los resultante cuerpos de inclusión en 2 l de tampón TBS, que contiene LDAO al 0,5% (N-óxido de N-,N-dimetilododecilamina, Fluka). Se lavaron repetidamente los cuerpos de inclusión hasta que no se detectó

proteína residual significativa en el sobrenadante de lavado. Finalmente, se lavaron los cuerpos de inclusión dos veces con tampón TBS sin LDAO.

Replegamiento de ESBA105:

5 Se solubilizaron los cuerpos de inclusión en el volumen de 10 veces de tampón de solubilización que contiene guanidinio-HCl 6 M, Tris 100 mM, EDTA 1 mM y DTT 20 mM a pH 8,0 y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Entonces se replegó la proteína solubilizada mediante dilución 1:50 en tampón de replegamiento que contiene urea 3 M, Tris 100 mM y 2 mM de cada una de cisteína y cistina a pH 8,5. Se continuó el replegamiento durante 24 h a temperatura ambiente. Después del replegamiento, se eliminaron los precipitados mediante filtración profunda y se concentró la disolución de replegamiento hasta el 50% del volumen inicial.
10 Entonces se dializó la disolución de replegamiento concentrada frente al volumen de 4 veces de tampón PBS (fosfato de Na 50 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5) y se concentró adicionalmente hasta una concentración de proteína de aproximadamente 1 mg/ml.

Purificación de ESBA105 mediante cromatografía:

15 Se purificó ESBA105 en dos etapas de cromatografía: cromatografía de filtración en gel y de intercambio catiónico. Todas las etapas de cromatografía se realizaron mediante sistema de purificación ÄKTA (GE Healthcare).

Para la cromatografía de filtración en gel preparativa cromatografía, se usó una columna Sephadex S75 26/60 (GE Healthcare) se con tampón PBS (fosfato de Na 50 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5) como tampón de ejecución. Se eluyó la fracción de ESBA105 recogida a un volumen de retención de aproximadamente 185 ml como un único pico.

20 Se usó Fractogel EMD SO₃⁻ (M) (Merck) como resina de columna para la segunda etapa de cromatografía. Se equilibró la resina con cinco volúmenes de columna de tampón de equilibración (acetato de Na 50 mM, pH 5,5). Se diluyeron las fracciones de pico de ESBA105 de la filtración en gel 10 veces con acetato de Na 50 mM pH 5,5 y entonces se cargaron sobre la columna con una velocidad de flujo de 5 ml/min. Después de cargar, se lavó la columna con cinco volúmenes de columna de tampón de equilibración. Se usó un gradiente lineal de desde el 0 - 35% de tampón de elución (acetato de Na 50 mM, NaCl 500 mM, pH 5,5) en el plazo de 60 minutos y se usaron 25 5 ml/min para la elución de ESBA105. Se recogió el pico más prominente después de la elución y se identificó como ESBA105. Finalmente se dializó la fracción de ESBA105 recogida frente a PBS (fosfato de Na 50 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5) y se almacenó a -80°C.

Ejemplo 2: Caracterización biofísica de los scFv

30 Con el fin de investigar su “semejanza a fármaco”, se caracterizaron biofísicamente ESBA105 y algunos de sus derivados. La caracterización implicó la determinación de (1) parámetros de solubilidad (precipitación con PEG y valor de B₂₂; el valor de B₂₂ es una medida de la autointeracción de la proteína, que es importante en el crecimiento de cristales de proteína, la solubilización y agregación. Véase Valente *et al.*, Biophys J. diciembre de 2005; 89(6):4211-8. Publicación electrónica 30 de septiembre de 2005), (2) los valores de pI, (3) la medición de la desnaturalización térmica y caotrópica, y (4) la cuantificación de la fracción monomérica en comparación con la 35 fracción oligomérica. Los resultados de los puntos 1-3 se resumen en la tabla 1, que también incluye valores de potencia relativa tal como se determinan mediante el ensayo de L929 y KYM-1, respectivamente.

Tabla 1. Resumen de datos sobre algunos derivados de ESBA105.

SEQ	S _{máx}	Valor de B ₂₂
	I	(prec, con PEG) (SIC)
ESBA105	7,8	1,839 ± 0,133 -24,5 x 10 ⁻⁴ ± 3,8 x 10 ⁻⁴
ESBA105-QC2.2	7,8	nd nd
ESBA105-QC7.1		nd nd
ESBA105-QC11.2	8,2	1,913 ± 0,091 1,59 x 10 ⁻³ ± 5,9 x 10 ⁻⁵
ESBA105-QC15.2	7,8	1,857 ± 0,02 1,28 x 10 ⁻³ ± 3,0 x 10 ⁻⁴
ESBA105-QC23.2	7,8	1,881 ± 0,068 1,06 x 10 ⁻⁴ ± 2,9 x 10 ⁻⁵
ESBA105-H_F68A	7,8	nd nd
TB-H_F68V_F70L	7,8	nd nd
TB-H_F70L	7,8	nd nd
SEQ	Comienzo de la desnaturalización [°C]	[GdnHCl] en el punto medio del desplegamiento Potencia relativa: CE ₅₀ X / CE ₅₀ ESBA105
ESBA105	53	2,07 M 1,0 Células L929 / 1,0 Células KYM-1

SEQ		S _{máx}	Valor de B ₂₂		
ESBA105-QC2.2	58		nd	1,1	1,6
ESBA105-QC7.1			nd	nd	nd
ESBA105-QC11.2	58		2,33 M	0,8	1,3
ESBA105-QC15.2	26		2,30 M	1,37	1,5
ESBA105-QC23.2	58		nd	1,32	1,5
ESBA105-H_F68A	nd		nd	1,14	nd
TB-H_F68V_F70L	nd		nd	1,28	nd
TB-H_F70L	nd		nd	2,7	nd

Ejemplo 3: Estabilidad de scFv durante el almacenamiento

La estabilidad del scFv a lo largo del tiempo es una característica importante en el contexto de un producto farmacéutico. La figura 4 muestra un análisis del scFv ESBA105 (carriles 1-6) y el scFv QC15.2 (carriles 7-12) que se separaron mediante SDS-PAGE y se tiñeron con Coomassie después de dos semanas de almacenamiento a diferente temperatura (-80°C: carriles 1, 3, 5, 7, 9 y 11) o 40°C: carriles 2, 4, 6, 8, 10 y 12) y concentraciones (20 mg/ml: carriles 1, 2, 7 y 8; 10 mg/ml: carriles 3, 4, 9 y 10; 1 mg/ml: carriles 5, 6, 11 y 12). Los anticuerpos permanecieron estables a lo largo de todos los intervalos de temperatura y a todas las concentraciones sometidas a prueba, y no se hallaron signos de degradación o agregación.

Un anticuerpo que es estable a lo largo de un tiempo determinado debe retener también su actividad completa. Por tanto, se sometió a prueba ESBA105 ocho semanas después del almacenamiento a 37°C o -80°C en ensayos de L929 para determinar su actividad. El resultado se presenta en la figura 5, y no pudieron observarse diferencias entre las dos temperaturas.

Ejemplo 4: Penetración *ex vivo* de ESBA105 en ojos de conejo completos

Se sometió a prueba la cantidad de ESBA105 que penetra en diferentes compartimentos de ojos de conejo completos en diversas condiciones en un entorno *ex vivo*. Para estas series de experimentos, se colocaron los ojos de conejo en placas de prueba de incubación que tenían depresiones en su superficie. La depresión contenía la disolución de prueba de ESBA105 y se colocaron los ojos de conejo sobre las placas de prueba de tal manera que la córnea estaba en contacto con la disolución de prueba. Después de un tiempo de incubación de 4 horas a 37°C, se analizaron los diferentes compartimentos del ojo para determinar su contenido en ESBA105. Para este análisis, se usó una jeringa para retirar sondas del compartimento de interés (véase la figura 6) y se determinó la concentración de ESBA105 de la sonda mediante ELISA.

Se evaluaron las siguientes condiciones con la configuración experimental descrita anteriormente: se sometió a prueba ESBA105 a concentraciones de 1, 2, 5 y 10 mg/ml. Se sometió a prueba además la concentración de 1 mg/ml en presencia de ácido cáprico al 0,5%. Thiel *et al.* (Clin. Exp. Immunol. abril de 2002; 128 (1):67-74) mostraron previamente que el 0,5% de ácido cáprico potenciaba la penetración a través de córnea. Cuando se administró 1 mg/ml en presencia de ácido cáprico al 0,5%, se midió una concentración de ESBA105 en la parte anterior del ojo de aproximadamente 40 µg/ml, que era aproximadamente la misma en comparación con concentraciones medidas después de la administración de 10 mg/ml en ausencia de ácido cáprico (figura 7). De manera interesante, cuando se compararon los resultados de estos dos modos de administración en el humor vítreo, se midieron aproximadamente 40 ng/ml para la administración de 1 mg/ml con ácido cáprico y aproximadamente 125 ng/ml para 10 mg/ml sin ácido cáprico (figura 8). En ausencia de ácido cáprico las concentraciones medidas en los dos compartimentos revelaron una clara dependencia de las concentraciones aplicadas de 1, 2, 5 y 10 mg/ml (figura 8).

Se preincubaron las placas de prueba de incubación con ojos con tampón de bloqueo (leche en polvo al 5% con bajo contenido en grasa en PBS, pH 7,4) durante la noche a 4°C. Al siguiente día se lavaron las placas con PBS y después de eso se secaron mediante incubación a 37°C durante 30 minutos. Se llenaron los pocillos de las placas secadas con 125 µl de disolución de prueba cada uno y se colocaron ojos de conejo aislados en los pocillos de manera que sólo la córnea estaba en contacto con la disolución de prueba. Después de la incubación a 37°C y el 100% de humedad durante 4 horas, se lavaron los ojos durante 3 horas con PBS. Se llevó a cabo la paracentesis usando una aguja de 25G para la cámara anterior del ojo y una aguja de 22G para el cuerpo vítreo.

Se determinó la concentración de ESBA105 en las sondas mediante ELISA tal como sigue: Se centrifugaron las sondas con una microcentrífuga de sobremesa a 13.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Se diluyeron las sondas del compartimento anterior 1:10, 1:100 y 1:1000, se diluyeron las sondas del compartimento vítreo 1:5 en TBST (TBS complementado con Tween al 0,005%) que contenía leche en polvo al 0,5% con bajo contenido en grasa (a continuación en el presente documento denominada disolución de dilución) para las pruebas de ELISA.

Se recubrieron placas de 96 pocillos de ELISA (Nunc Maxisorb; número de catálogo 442404) con TNF α humano

0,5 µg/ml durante la noche a 4°C. Al siguiente día se lavaron las placas 3 veces con TBST a temperatura ambiente y se incubaron con 300 µl de tampón de bloqueo (leche en polvo al 5% con bajo contenido en grasa en TBST) por pocillo durante 60 min a temperatura ambiente en un agitador (500-600 rpm). Después de la etapa de bloqueo, se lavaron las placas 3 veces con TBST antes de que se añadieran 50 µl de sondas diluidas a cada pocillo y se incubaron las placas en un agitador (500 - 600 rpm) durante 90 minutos a temperatura ambiente. Después de esta etapa de incubación, se lavaron las placas 3 veces con TBST, antes de que se añadieran 50 µl de una disolución 1:10.000 (diluida en disolución de dilución) del anticuerpo secundario AKA3A-biotinilado a cada pocillo. AKA3A-biotinilado es un anticuerpo policlonal de conejo anti-ESBA105, que estaba recién biotinilado (según protocolos de biotinilación convencionales). Después de 90 minutos de incubación en un agitador (500-600 rpm) a temperatura ambiente, se lavaron las placas 3 veces con TBST, antes de que se añadieran 50 µl de una dilución 1:2000 (diluida en disolución de dilución) de peroxidasa del rábano acoplada con estreptavidina (estreptavidina-poliHRP40, 1 mg/ml; SDT; n.º SP40C). Después de 60 minutos de incubación en un agitador (500-600 rpm) a temperatura ambiente, se lavaron las placas 3 veces con TBST y 2 veces con ddH₂O. Se detectó la actividad peroxidasa del rábano (HRP) tras la adición de 50 µl de sustrato BM Blue POD (Roche Diagnostics, número de catálogo 1484281) a cada pocillo. Después de 6-12 minutos de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad, se detuvo la reacción de HPR mediante la adición de 50 µl de HCl 1 M a cada pocillo. Se cuantificó la reacción de HPR mediante medición espectrométrica a 450 nm en un lector TECAN Genios.

Se determinó finalmente la concentración de ESBA105 de las sondas mediante comparación con una curva patrón, que se produjo en paralelo.

20 **Ejemplo 5: Penetración de ESBA105a través de monocapas de células Caco-2**

Se sembraron células de adenocarcinoma de colon humano (Caco-2) sobre soportes permeables de una placa de 24 transpocillos y se cultivaron durante 21 días a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂ para permitir la formación de monocapas apretadas. Antes de realizar el ensayo de permeabilidad, se midió la resistencia eléctrica transepitelial en cada pocillo para verificar la integridad de las monocapas. Entonces se lavaron las monocapas de Caco-2 tres veces con una disolución salina (HBSS) y se añadió una mezcla que contenía o bien 1 µM de ESBA105 con o sin caprato, o bien medio de ensayo solo al compartimento superior de los transpocillos como control. Después de puntos de tiempo definidos, se recogió el contenido de los compartimentos inferiores y se reemplazó por medio de ensayo nuevo. Se analizaron posteriormente las muestras recogidas mediante ELISA cuantitativo para determinar la cantidad de ESBA105 que penetró a través de la monocapa epitelial de Caco-2 (figura 9).

30 **Ejemplo 6: Penetración a través de yeyuno de ratón**

Se extirparon aproximadamente 5 cm de yeyuno de ratón inmediatamente después de la eutanasia del animal y se incubaron en tampón de Ringer-Krebs saturado con oxígeno y se lavaron tres veces con tampón de Ringer-Krebs. Se ligó una sección de 3,5 cm con seda quirúrgica y se llenó con 200 mcl de mezcla de anticuerpos, que contenía 1 mg/ml de cada formato de anticuerpo (Infliximab y ESBA105). A aproximadamente 1 cm distal del compartimento del saco evertido se añadió una segunda ligación para garantizar la estanqueidad del compartimento. Se colocaron los sacos evertidos en un vaso de precipitados que contenía 10 ml de tampón de Ringer-Krebs saturado con oxígeno de tal manera que sólo las primeras ligaciones entraron en contacto con el tampón. Se añadieron inhibidores de proteasas a este compartimento receptor para impedir la degradación de anticuerpos. Con el fin de determinar la cantidad de cada anticuerpo que penetró a través del tejido intestinal, se tomaron sondas de 200 mcl del compartimento receptor después de puntos de tiempo definidos y se analizaron posteriormente mediante ELISA cuantitativo.

Ejemplo 7: Aplicación tópica de un polipéptido de unión a antígeno soluble

Se estudiaron la farmacodinámica y farmacocinética de la aplicación tópica de un polipéptido de unión a antígeno soluble, ESBA105, en ojos de conejo *in vivo*. Se prepararon cuatro formulaciones diferentes. La primera formulación (denominada en el presente documento "B15") se componía de 9,6 mg/ml de ESBA105 en tampón fosfato 0,15 M a pH 6. La segunda formulación (denominada en el presente documento "B16") se componía de 10,3 mg/ml de ESBA105 y clorhexidina al 0,01% (p/v) en tampón fosfato de sodio 0,15 M a pH 6. El primer control (denominado en el presente documento "B15-0") se componía de tampón fosfato de sodio 0,15 M a pH 6. El segundo control (denominado en el presente documento "B16-0") se componía de clorhexidina al 0,01% (p/v) en tampón fosfato de sodio 0,15 a pH 6. Se esterilizaron todas las formulaciones antes de su uso, y se almacenaron a 4° C. Tal como se usa en el presente documento, "OTT" indica sin tratamiento.

Para estudiar la farmacodinámica de ESBA105 en el ojo, se usaron 6 conejos para cada formulación. Se sometió a prueba la formulación en ambos ojos de los conejos. Se usaron dos conejos (4 ojos) para cada formulación sin fragmentos de anticuerpo, y se usaron dos conejos (4 ojos) como controles sin tratamiento previo. Se usaron un total de 18 conejos para este estudio.

Se aplicaron las formulaciones localmente a los ojos a lo largo del transcurso de seis días. Se trataron los conejos cinco veces al día, en la hora siete, hora diez, hora trece, hora diecisiete y hora veinte. En el día de sacrificio, se trataron los conejos dos veces, en la hora siete y hora diez, y se sacrificaron una hora después de la última aplicación.

5 Se evaluaron los ojos en el día uno, día tres y día seis. Se usaron dos conejos por formulación para reunir datos farmacocinéticos para cada punto de tiempo. Se tomaron una muestra de humor acuoso y una muestra de suero en el día uno y día tres. En el día seis, se tomaron una muestra de humor acuoso y una muestra de suero y se diseccionaron los ojos de los conejos para dar tejidos con el fin de estudiar la distribución del fragmento de anticuerpo en los diferentes tejidos oculares. Los resultados de este estudio se representan gráficamente en las
10 figuras 11a a 11d.

Se realizaron estudios adicionales para estudiar la solubilidad, farmacodinámica y farmacocinética de ESBA105. Los resultados se registran en las figuras 12 a 16. Tal como puede observarse a partir de estas figuras, se ha mostrado que ESBA105 penetra a través de capas de tejido corneal en conejos y cerdos. ESBA105 se acumula en el humor vítreo y tiene un tiempo medio local de aproximadamente 25 horas. El tiempo medio local de ESBA105 en la cámara anterior es significativamente menor que en el humor vítreo. La exposición sistémica tras el tratamiento tópico es extremadamente baja, por ejemplo, de aproximadamente el 2% de la concentración local más alta. Además, basándose en el experimento tópico en conejo, pueden alcanzarse niveles de fármaco terapéuticos (aproximadamente 16.000 veces con respecto a TNF) con tan sólo cinco gotas tópicas al día. Por tanto, la aplicación tópica de fragmentos de anticuerpos scFv inhibidores de TNF podría ser una terapia eficaz en enfermedades localizadas en segmentos más posteriores del ojo, por ejemplo, humor vítreo y retina.

Ejemplo 8: Respuesta a la dosis en el modelo de monoartritis aguda de rata

Para estudiar la respuesta a la dosis, se administró ESBA105 tal como se muestra en la figura 17. Como comparación, se administró Remicade® (infliximab) tal como se muestra en la figura 17. Para este experimento, se administró TNF α con tres dosificaciones diferentes (156 μ g, 45 μ g u 11 μ g) de ESBA105 o infliximab. Como
25 controles, se usaron PBS, y TNF solo (10 μ g i.a.), o scFv solo. Los resultados se muestran en la figura 17.

Ejemplo 9: Aplicación tópica *in vivo*

Para determinar la exposición sistémica máxima y los niveles de fármaco locales durante un día de administración tópica, se administró una gota cada 20 minutos a lo largo de un periodo de 10 horas. Se midieron los niveles de fármaco mediante ELISA en humor acuoso, vítreo y suero. Se formuló ESBA105 como 10 mg/ml en PBS, pH 6,5.
30 Para cada gota, se aplicaron 30 mcl a la parte superior de la pupila, y entonces se apretaron los párpados del ojo para eliminar el fluido en exceso. Los resultados se muestran en la figura 18 y la tabla 2.

Tabla 2: Muestra las concentraciones de ESBA105 máximas (C_{máx}) medidas en los compartimentos indicados en el transcurso del experimento tal como se describe en la leyenda de la figura 18 A. Los valores en porcentaje indican el porcentaje de C_{máx} en comparación con la dosis aplicada total (dosis acumulada).

	C _{máx}	Dosis acumulada total
Humor vítreo	4,0 ng/ml (6,6E-5%)	9 mg
Humor acuoso	5,3 ng/ml (1,2E-5%)	9 mg
Suero	14,2 ng/ml (0,3%)	9 mg

Ejemplo 10: Aplicación tópica de un polipéptido de unión a antígeno soluble

Para determinar la exposición sistémica máxima y los niveles de fármaco locales durante el tratamiento crónico tópica de baja frecuencia, se aplicó una gota 5 veces al día a dos conejos (4 ojos) durante hasta 6 días. Para cada gota, se aplicaron 30 mcl de ESBA105 en el saco del ojo inferior (presentación de fármaco principalmente a la esclerótica), quedando 30 mcl completos en la superficie ocular.

40 Se evaluaron los ojos después de la segunda gota en el día dos, día tres y día seis. Se midieron los niveles de fármaco mediante ELISA en humor acuoso, humor vítreo, neurorretina, coroides y suero. Los resultados de este estudio se representan gráficamente en las figuras 19a a 19e.

La tabla 3 resume la mediana de las concentraciones del scFv ESBA105 hallada después del 6º sexto día de administración en los compartimentos indicados en [ng/ml].

45

Tabla 3: Mediana de las concentraciones del scFv ESBA105 hallada después del 6º sexto día de administración

	Humor acuoso	Humor vítreo	Neuroretina	Coroides	Suero
Mediana de la concentración del scFv después del 6º día [ng/ml]	~100	~350	~300	~100	<1

Esta descripción debe interpretarse como ilustrativa sólo y es para el fin de enseñar a los expertos en la técnica el mejor modo para llevar a cabo la presente invención. Se pretende que la presente invención esté limitada sólo hasta el grado requerido por las reivindicaciones adjuntas y las leyes aplicables.

- 5 En el caso de que uno o más de las referencias mencionadas y materiales similares difieran de o contradiga esta solicitud, incluyendo términos definidos, uso de términos, técnicas descritas, o similares, prevalece esta solicitud.

Los encabezamientos de sección usados en el presente documento son para fines de organización sólo y no deben interpretarse como limitativos de la materia descrita de ninguna manera.

- 10 Aunque la presente invención se ha descrito conjuntamente con diversas realizaciones y ejemplos, no se pretende que las presentes enseñanzas se limiten a tales realizaciones o ejemplos.

Lista de secuencias

<110> ESBATech AG

<120> Anticuerpos scFv que atraviesan capas epiteliales y/o endoteliales

15

<130> P100410PC00

<150> Documento US 60/819.378

<151> 10-07-2006

20

<160> 21

<170> PatentIn versión 3.3

25

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> VL del tipo kappa1

<400> 1

ES 2 603 399 T3

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 2
<211> 108
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> VL del tipo kappa1

<400> 2
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Glu
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Gly Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Leu Pro Tyr
85 90 95

Met Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
100 105

15 <210> 3
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> VL del tipo kappa3

<400> 3

ES 2 603 399 T3

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

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

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

Tyr Gly Ala Thr Thr Arg Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Ala Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys His Trp Pro Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 4
<211> 108
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> VL del tipo kappa3

<400> 4
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Leu Thr His Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asn Ser Trp Pro His
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 5
15 <211> 111
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
20 <223> VL del tipo lambda1

<400> 5

ES 2 603 399 T3

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Asp Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Gln Leu Leu
35 40 45

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

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

Ser Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 6
<211> 109
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> VL del tipo lambda 3

<400> 6
Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Thr Val Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Arg Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
85 90 95

Asn Val Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 7
15 <211> 109
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
20 <223> VL del tipo lambda 3

<400> 7

ES 2 603 399 T3

Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Gly Gly Asn Asn Ile Glu Thr Ile Ser Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Ser
35 40 45

Asp Asp Ser Val Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp Tyr
85 90 95
Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105

5 <210> 8
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> VH del tipo H1b

<400> 8
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Phe Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Val Pro Arg Gly Thr Tyr Leu Asp Pro Trp Asp Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15 <210> 9
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> VH del tipo H3

ES 2 603 399 T3

<400> 9

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala His Val Leu Arg Phe Leu Glu Trp Leu Pro Asp Ala Phe Asp
100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

5

<210> 10

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> VH del tipo H3

<400> 10

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

Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Asn Asp Gly Arg Ile Glu His Tyr Ala Asp Ala Val
50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Asn Thr Val Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ile Gly Ala Thr Gly Tyr Leu Asp Asn Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

15

<210> 11

<211> 122

ES 2 603 399 T3

<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> VH del tipo H3

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

10 <210> 12
<211> 245
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> TB-A

<400> 12
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
 20 25 30
 Val Val Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Phe Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Arg Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Arg
 85 90 95

ES 2 603 399 T3

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg Gly Gly Gly Gly
 100 105 110
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 130 135 140
 Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
 145 150 155 160
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 165 170 175
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Lys Phe
 180 185 190
 Lys Asp Arg Phe Thr Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Val Tyr
 195 200 205
 Met Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 210 215 220
 Ala Arg Glu Arg Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 225 230 235 240
 Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 13
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> ESBA105

10

<400> 13
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
 20 25 30
 Val Val Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Phe Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Arg Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

ES 2 603 399 T3

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

<210> 14
 <211> 245
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> TB-WT

10 <400> 14
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Thr Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
 20 25 30
 Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Met Leu Met
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Phe Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

ES 2 603 399 T3

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
130 135 140

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
145 150 155 160

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
165 170 175

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
180 185 190

Lys Glu His Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Val Phe
195 200 205

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
210 215 220

Ala Arg Glu Arg Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 15
<211> 251
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> scFv Lucentis

10

<400> 15
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile

ES 2 603 399 T3

35 40 45
 Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly
 100 105 110
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 130 135 140
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr
 145 150 155 160
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 165 170 175
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 180 185 190
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 195 200 205
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 210 215 220
 Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Thr Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 225 230 235 240
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250

<210> 16
 <211> 20
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> ligador

10 <400> 16
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser
 20

15 <210> 17
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 603 399 T3

<220>
<223> ligador

<400> 17
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
1 5 10 15

5 Gly Gly Gly Ser
20

<210> 18
<211> 245
<212> PRT
10 <213> Artificial

<220>
<223> ESBA105-QC15.2

15 <400> 18
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30
Val Val Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Phe Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Arg Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg Gly Gly Gly Gly
100 105 110
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser
115 120 125
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
130 135 140
Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr

ES 2 603 399 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
130 135 140

Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
145 150 155 160

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
165 170 175

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Lys Phe
180 185 190

Lys Asp Arg Ala Thr Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Val Tyr
195 200 205

Met Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
210 215 220

Ala Arg Glu Arg Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 20
<211> 245
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> TB-H_F68V_F70L

<400> 20
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Phe Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Arg Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg Gly Gly Gly Gly
100 105 110

ES 2 603 399 T3

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser
 115 120 125

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 130 135 140

Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
 145 150 155 160

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 165 170 175

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Lys Phe
 180 185 190

Lys Asp Arg Val Thr Leu Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Val Tyr
 195 200 205

Met Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 210 215 220

Ala Arg Glu Arg Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 21
 <211> 245
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> TB-H_F70L

10 <400> 21
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
 20 25 30

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

Tyr Ser Ala Phe Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Arg Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

ES 2 603 399 T3

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg Gly Gly Gly Gly
 100 105 110
 ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 130 135 140
 Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
 145 150 155 160
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 165 170 175
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Lys Phe
 180 185 190
 Lys Asp Arg Phe Thr Leu Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Val Tyr
 195 200 205
 Met Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 210 215 220
 Ala Arg Glu Arg Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 225 230 235 240
 Val Thr Val Ser Ser
 245

Bibliografía:

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Roberts, K., y Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4ª ed.
- 5 Alfthan *et al.*, (1995). Properties of a single-chain antibody containing different linker peptides. *Protein Eng.* 8:725-731.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- 10 Auf der Maur, A., Escher, D., and Barberis, A. (2001). Antigen-independent selection of stable intracellular singlechain antibodies. *FEBS Lett* 508, 407-412.
- Auf der Maur, A., Tissot, K., y Barberis, A. (2004). Antigen-independent selection of intracellular stable antibody frameworks. *Methods* 34, 215-224.
- Auf der Maur, A., *et al.*, Direct in vivo screening of intrabody libraries constructed on a highly stable single-chain framework. *J Biol Chem*, 277(47): p. 45075-85, 2002.
- 15 Benitez Del Castillo, JM. *et al.* (2004) Long-term treatment of refractory posterior uveitis with anti-TNF α (infliximab). *Eye*, 24 de septiembre, publicación electrónica antes de la impresión.
- Binz *et al.* (octubre de 2005) *Nat Biotech* 23(10): 1257-68.
- Bird, RE, Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S., y Whitlow, M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242, 423-426.
- 20 Bonfioli y Orefice (2005). Behçet's disease. *Semin Ophthalmol* 20(3), 199-206.

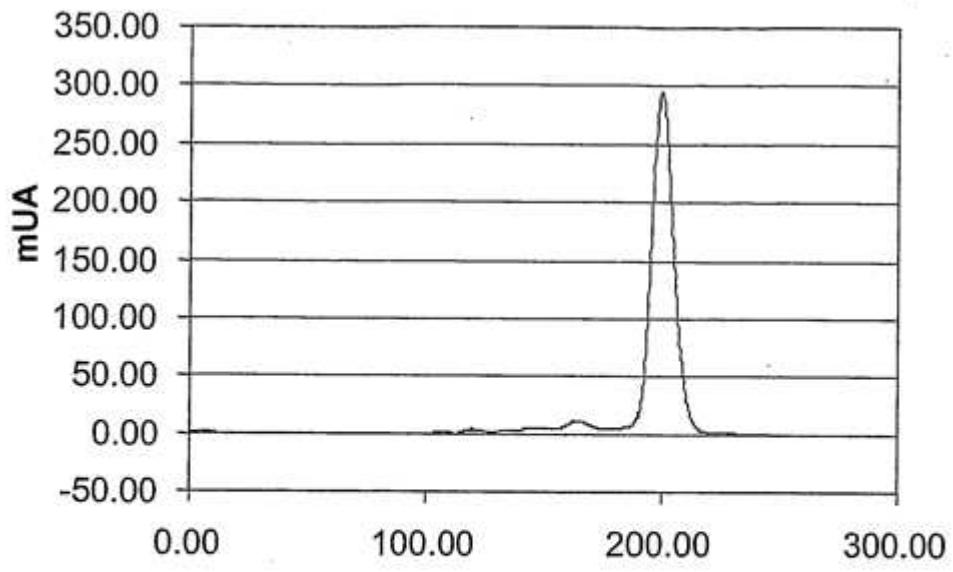
- Boyd *et al.* (2001). Immunopathology of the non-infectious posterior and intermediate uveitides. *Surv Ophthalmol* 46, 209-233.
- Chothia, C., y Lesk, A. M. (1987). Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol* 196, 901-917.
- 5 Chothia, C., Novotny, J., Bruccoleri, R., y Karplus, M. (1985). Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. *J Mol Biol* 186, 651-663.
- Degim, I.T y Celebi, N. (2007), Controlled delivery of peptides and proteins. *Current Pharmaceutical Design*, 13, 99-117.
- 10 Dick, AD. *et al.* (1997) Immunosuppressive therapy for chronic uveitis:optimising therapy with steroids and cytosporin A. *Br. J. Ophtalmol.* 81, 1107-1112.
- Direskeneli (2001). Behçet's disease: infectious aetiology, new autoantigens, and HLA-B51. *Ann Rheum Dis* 60, 996-1002.
- Doring, E. Stigler R, Grutz G, von Baehr R, y Schneider-Mergener J. (1994). Identification and characterization of a TNF alpha antagonist derived from a monoclonal antibody. *Mol Immunol.* 31:1059-67.
- 15 El-Shabrawi, Y. y Hermann J. (2002) Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy with infliximab as an alternative to corticosteroids in the treatment of human leukocyte B27-associated acute anterior uveitis. *Ophthalmology* 109, 2342-2346.
- 20 El-Shabrawi, Y. *et al.* (2003) Anti-tumor necrosis factor alpha treatment in chronic recurrent inflammation of the anterior segment of the eye in patients resistant to standard immunomodulatory treatment. *Ann Rheum Dis.* 62, 1243-1244.
- Evereklioglu (2005). Current concepts in the etiology and treatment of Behçet's disease. *Surv Ophthalmol* 50(4), 297-350.
- Giansanti *et al.* (2004). Infliximab for the treatment of posterior uveitis with retinal neovascularization in Behçet's disease. *Eur J Ophthalmol* 14(5), 445-448.
- 25 Holliger, P. y Hudson, P. (2005), *Nat. Biotechnol.* 23(9), págs. 1126-1136.
- Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883.
- Johnson, P.H., y Quay, S.C. (2000). Advances in nasal drug delivery through tight junction technology. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2:281-298.
- Joseph, A. *et al.* (2003) Infliximab in the treatment of refractory posterior uveitis. *Ophthalmology* 110, 1449-1453.
- 30 Kötter *et al.* (2003). Human recombinant interferon alfa 2a for the treatment of Behçet's disease with sight threatening posterior or panuveitis. *Br J Ophthalmol* 87, 423-431.
- Lanthier *et al.* (2005). Infliximab in the treatment of posterior uveitis Behçet's disease. *Presse Med* 34, 916-918.
- Lightman, S., y Kok H. (2002) Developments in the treatment of uveitis. *Expert Opin. Investig. Drugs* 11, 59-67.
- Lindstedt *et al.* (2005). Anti-TNF-alpha therapy for sight threatening uveitis. *Br J Ophthalmol* 89(5), 533-536.
- 35 Murphy, CC. *et al.* (2004) Neutralizing tumor necrosis factor activity leads to remission in patients with refractory noninfectious posterior uveitis. *Arch. Ophtalmol.* 122, 845 851.
- Ozen (1999). Vasculopathy, Behçet's syndrome, and familial Mediterranean fever. *Curr Opin Rheumatol* 11, 393-398.
- Ohno *et al.*, (2004). Efficacy, safety, and pharmacokinetics of multiple administration of infliximab in Behçet's disease with refractory uveoretinitis. *J Rheumatol* 31, 1362-1368.
- 40 Perez-Guijo, V. *et al.* (2004) Tumour necrosis factor-alpha levels in aqueous humour and serum from patients with

- uveitis: the involvement of HLA-B27. *Curr. Med. Res. Opin.* 20, 155-157.
- Powers C. *et al.* Pleiotrophin signalling through anaplastic lymphoma kinase is rate-limiting for glioblastoma growth. *The Journal of biological chemistry* 277(16), 14153-14158, 2002.
- 5 Power, WJ. *et al.* Outcomes in anterior uveitis associated with the HLA-B27 haplotype. *Ophthalmology* 105, 1646-1651 1998.
- Reiff, A. *et al.* (2001) Etanercept therapy in children with treatment-resistant uveitis. *Arthrit. Rheum.* 44, 1411-1415.
- Rosenbaum (2004). Blind insight: Eyeing anti-tumor necrosis factor treatment in uveitis associated with Behçet's disease. *J Rheumatol* 31(7), 1241-1243.
- Sakane *et al.* (1999). Behcet's disease. *N Engl J Med* 341, 1284-1291.
- 10 Schaerer-Brodbeck, C. y A. Barberis, Coupling homologous recombination with growth selection in yeast: a tool for construction of random DNA sequence libraries. *Biotechniques*, 37(2): p. 202-206, 2004.
- Sfikakis, PP. *et al.* (2001) Effect of infliximab on sight-threatening pan-uveitis in Behcet's disease. *Lancet* 358, 295-296.
- 15 Suhler *et al.* (2005). A prospective trial of infliximab therapy for refractory uveitis: preliminary safety and efficacy outcomes. *Arch Ophthalmol* 123(7), 903-912.
- Stocks, M.R. (2004). Intrabodies: production and promise. *Drug Discov. Today* 15:960-966.
- Thiel, MA. *et al.* (2002). Penetration of engineered antibody fragments into the eye. *Clin. Exp. Immunol.* 128, 67-74.
- Tugal-Tutkun *et al.* (2004). Uveitis in Behçet's disease: an analysis of 880 patients. *Am J Ophthalmol* 138, 373-380.
- 20 Tugal-Tutkun *et al.* (2005). Efficacy of infliximab in the treatment of uveitis that is resistant to treatment with the combination of azathioprine, cyclosporine, and corticosteroids in Behçet's disease. *Arthritis Rheum* 52(8), 2478-2484.
- Tursen *et al.*, (2003). Evaluation of clinical findings according to sex in 2313 Turkish patients with Behçet's disease. *Int J Dermatol* 42, 346-351.
- Verity *et al.* (1999). Behcet's disease, the Silk Road and HLA-B51: historical and geographical perspectives. *Tissue Antigens* 54, 213-220.
- 25 Verity *et al.*, (1999b). HLA and tumour necrosis factor (TNF) polymorphisms in ocular Behçet's disease. *Tissue Antigens* 54, 264-272.
- Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546.
- Wechsler *et al.* (2004). Infliximab in refractory uveitis due to Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol* 22 (4 suppl. 34), S 14-S16.
- 30 Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania 1987).
- Worn, A., Auf der Maur, A., Escher, D., Honegger, A., Barberis, A., Plückthun, A. (2000). Correlation between in vitro stability and in vivo performance of anti-GCN4 intrabodies as cytoplasmic inhibitors. *J Biol. Chem.* 275:2795-803.
- Yurdakul *et al.* (2004). Behçet's syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 16, 38-42.
- Zierhut *et al.* (2003). Immunology and functional genomics of Behçet's disease. *Cell Mol Life Sci* 60, 1903-1922.
- 35

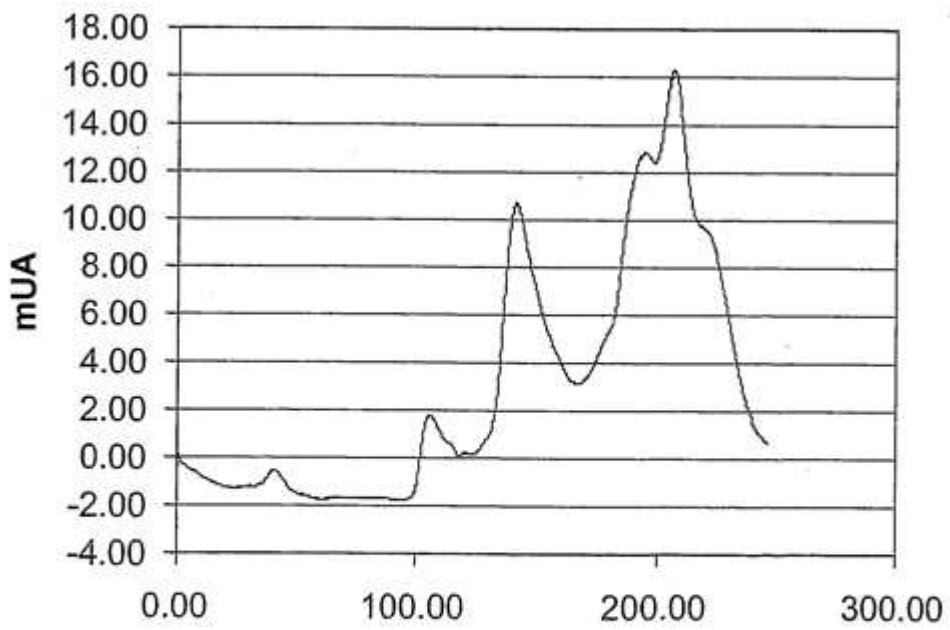
REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica formulada para la aplicación local a una superficie de una barrera de tejido epitelial, comprendiendo dicha composición un polipéptido de unión a antígeno soluble y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que dicho polipéptido de unión a antígeno puede cruzar una córnea de mamífero intacta en menos de 8 horas en ausencia de un potenciador de la penetración, y en la que dicho polipéptido de unión a antígeno es un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) y comprende:
- 10 (a) una región de entramado de dominio variable de cadena ligera (VL) de una similitud de al menos el 85% con una región de entramado de VL seleccionada del grupo que consiste en las SEQ. ID. NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7; y una región de entramado de dominio variable de cadena pesada (VH) de una similitud de al menos el 85% con una región de entramado de VH seleccionada del grupo que comprende SEQ. ID. NO: 8, 9, 10 y 11; o
- (b) la secuencia de SEQ. ID. NO: 13.
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 que es para aplicación tópica a un ojo.
3. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, formulada para obtener una concentración intraocular del polipéptido de unión a antígeno de al menos 100 ng/ml.
- 15 4. Composición farmacéutica según la reivindicación 2 ó 3, en la que el polipéptido de unión a antígeno se formula para la aplicación tópica al ojo y puede atravesar la córnea y pasar a un espacio intraocular en ausencia de potenciador de la penetración.
5. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en la que la composición está en forma de colirio.
- 20 6. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición tiene un pH de menos de 8.
7. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el polipéptido es suficientemente soluble como para transitar por la una o más capas epiteliales en menos de 4 horas.
- 25 8. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende además uno o más agentes de potenciación de la penetración.
9. Composición farmacéutica según la reivindicación 8, en la que el agente de potenciación de la penetración se selecciona del grupo que consiste en Azone, cloruro de benzalconio (BzCl), BL-7, BL-9, Brij 35, Brij 78, Brij 98, Brij 99, polioxietileno-polioxipropileno 1800, caprato de sodio, ácido caprílico, cloruro de cetilpiridinio, clorhexidina, colato, aceite de ricino, aceite de maíz, Cremophor-EL, DMSO, bromuro de decametonio, desoxicolato, sulfato de dextrano, EDTA, edetato de disodio, etanol, fusidato, glicocolato, laurilsulfato, L- α -lisofosfatidilcolina, N-lauroilsarcosina, NMP, ácido oleico, fosfolípidos, lauril éter de polioxietileno 9, saponina, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, taurocolato y taurodesoxicolato, en particular caprato de sodio.
- 30 10. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el polipéptido tiene una afinidad de unión por un antígeno diana de una KD de al menos $10E-6$ M o menos.
- 35 11. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende el polipéptido de unión a antígeno en una concentración mayor de 2 mg/ml, o mayor de 2,5 mg/ml, preferiblemente mayor de 5 mg/ml, más preferiblemente mayor de 10 mg/ml.
12. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el polipéptido de unión a antígeno obtiene una concentración intraocular mayor de 100 ng/ml.
- 40 13. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el polipéptido de unión a antígeno es estable a una temperatura de desde -80 grados centígrados hasta 37 grados centígrados.
14. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el polipéptido de unión a antígeno sigue siendo estable durante al menos ocho semanas.
- 45 15. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el polipéptido de unión a antígeno sigue siendo estable durante al menos seis semanas a 4 grados centígrados.

16. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el polipéptido de unión a antígeno sigue siendo estable durante 1 mes, preferiblemente al menos dos meses, lo más preferido al menos seis meses a de 20°C a 40°C, preferiblemente a 37°C en PBS.
- 5 17. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el polipéptido de unión a antígeno es estable en condiciones reductoras tal como se mide en un ensayo de interacción con levaduras denominado "control de calidad".
18. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el polipéptido sigue estando en forma monomérica en condiciones fisiológicas.
- 10 19. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el polipéptido es soluble a temperatura ambiental en PBS a concentraciones mayores de 1 mg/ml, preferiblemente mayores de 4 mg/ml, más preferiblemente mayores de 10 mg/ml, incluso más preferiblemente mayores de 25 mg/ml, o lo más preferiblemente mayores de 50 mg/ml.
- 15 20. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el polipéptido revela un punto medio de transición en valoración con clorhidrato de guanidinio de al menos 1,5 M, preferiblemente al menos 1,75 M, más preferiblemente al menos 1,9 M o lo más preferiblemente al menos 2 M.
21. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la solubilidad o cinética de tránsito del polipéptido de unión a antígeno se mide mediante un ensayo seleccionado de un ensayo de monocapa de células epiteliales Caco-2 convencional, un ensayo de solubilidad de un solo híbrido o de doble híbrido intracelular convencional y un ensayo de permeabilidad con yeyuno de ratón convencional.
- 20 22. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que solubilidad se mide mediante un ensayo de precipitación con PEG convencional o un ensayo de cromatografía de autointeracción (SIC).
23. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que
- 25 (a) la región de entramado de dominio variable de cadena ligera (VL) tiene una similitud de al menos el 85% con SEQ. ID. NO: 2 y la región de entramado de dominio variable de cadena pesada (VH) tiene una similitud de al menos el 85% con SEQ. ID. NO: 8;
- (b) la región de entramado de dominio variable de cadena ligera (VL) tiene una similitud de al menos el 85% con SEQ. ID. NO: 4 y la región de entramado de dominio variable de cadena pesada (VH) tiene una similitud de al menos el 85% con SEQ. ID. NO: 10, o
- 30 (c) la región de entramado de dominio variable de cadena ligera (VL) tiene una similitud de secuencia de al menos el 95% con SEQ. ID. NO: 7 y la región de entramado de dominio variable de cadena pesada (VH) tiene una similitud de secuencia de al menos el 95% con SEQ. ID. NO: 8.
24. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la afinidad del anticuerpo por su antígeno se caracteriza por una constante de disociación KD de menos de 100 nM.
- 35 25. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el anticuerpo tiene especificidad por TNF α humano.
26. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el anticuerpo se modifica químicamente.
- 40 27. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el excipiente se selecciona del grupo que comprende cloruro de benzalconio, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 y clorhexidina.



ml
Fig. 1A



ml
Fig. 1B

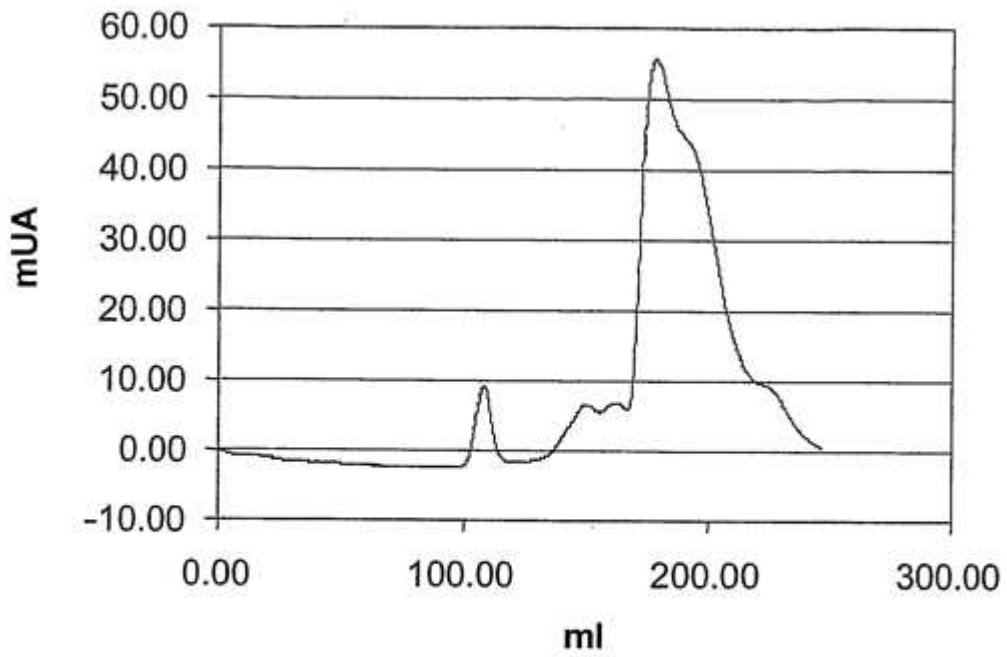


Fig. 1C

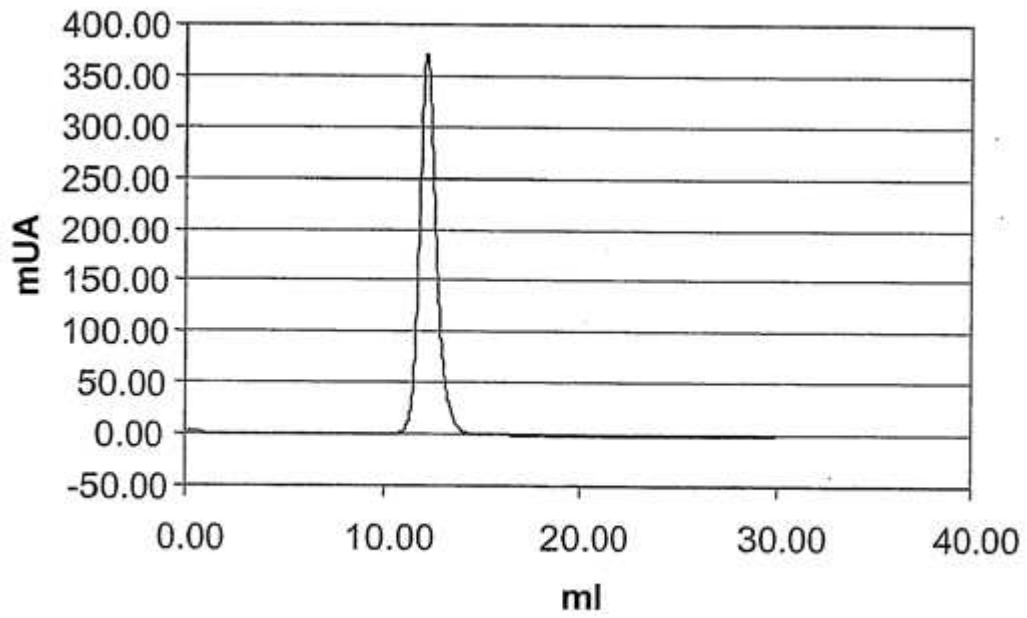


Fig. 2

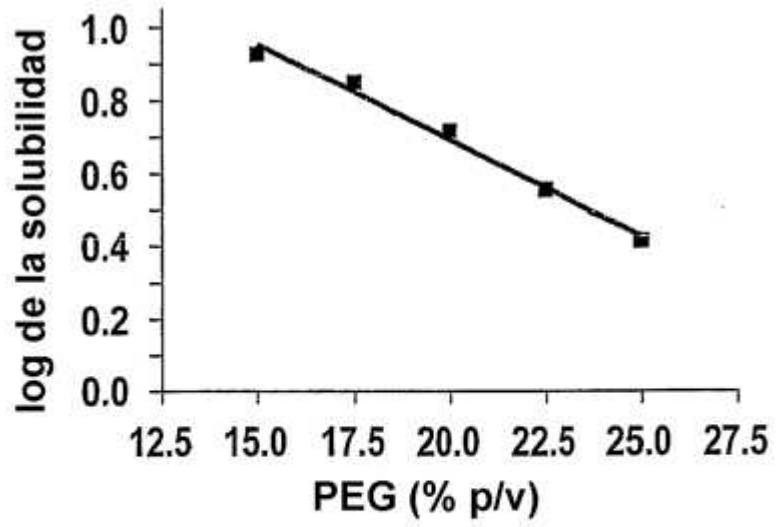


Fig. 3



Fig. 4

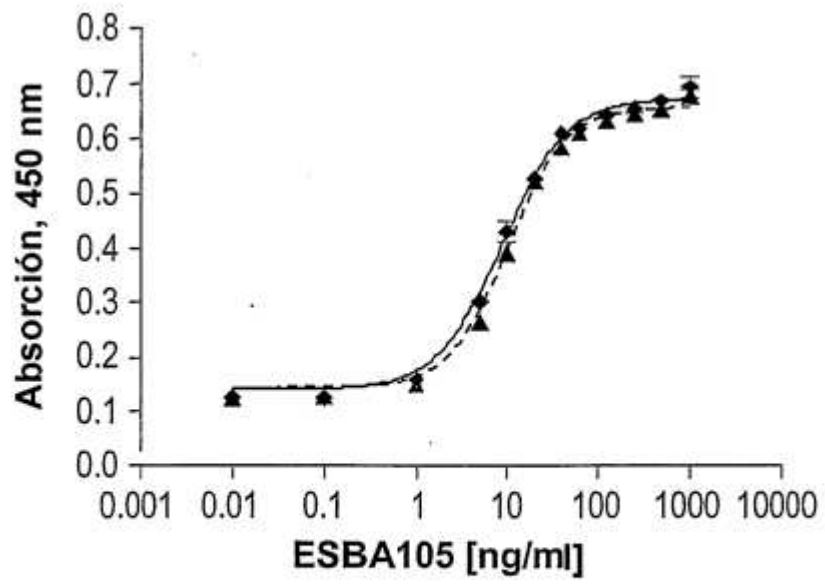


Fig. 5

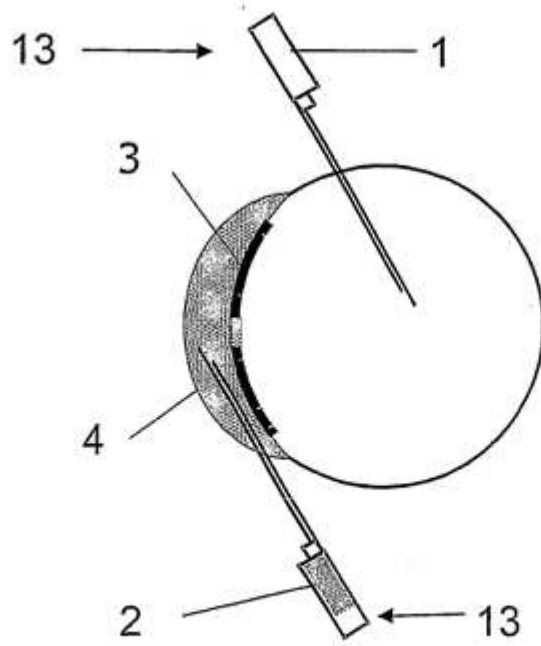


Fig. 6

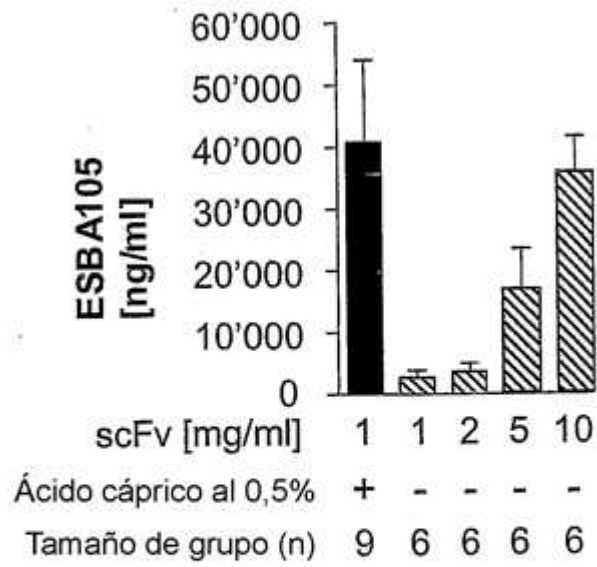


Fig. 7

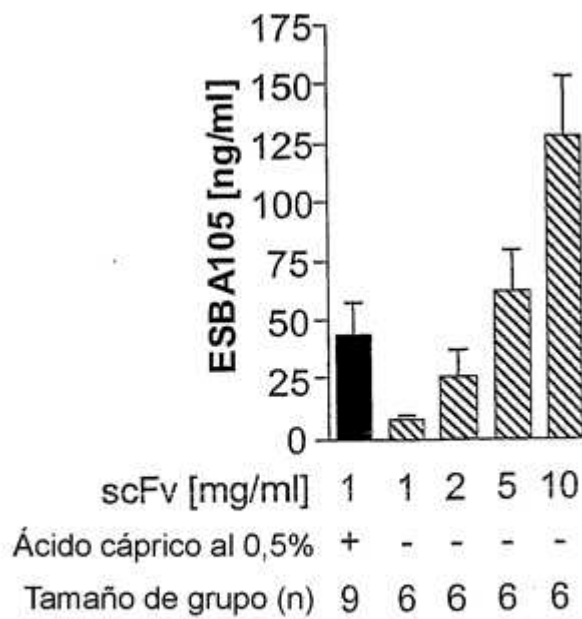


Fig. 8

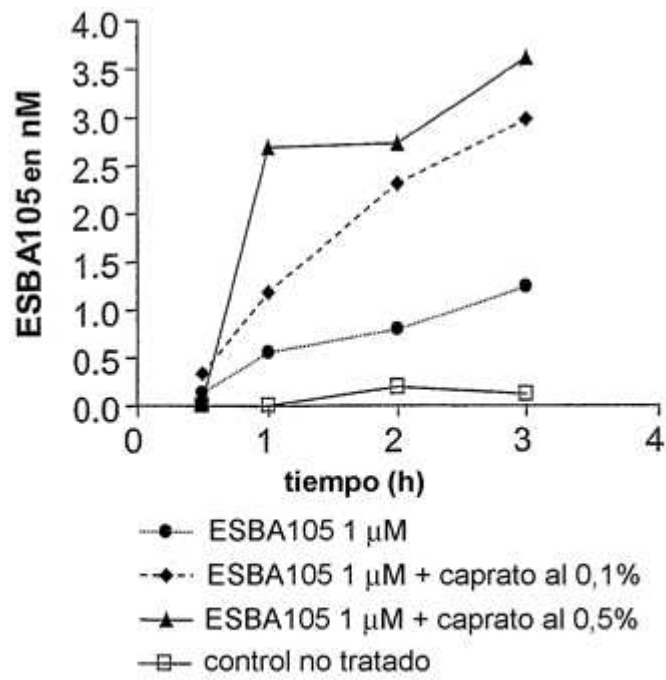


Fig. 9

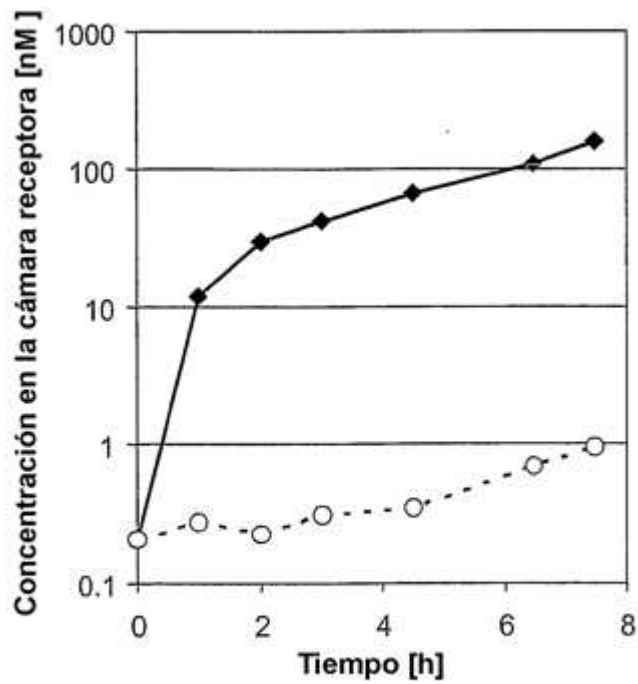


Fig. 10

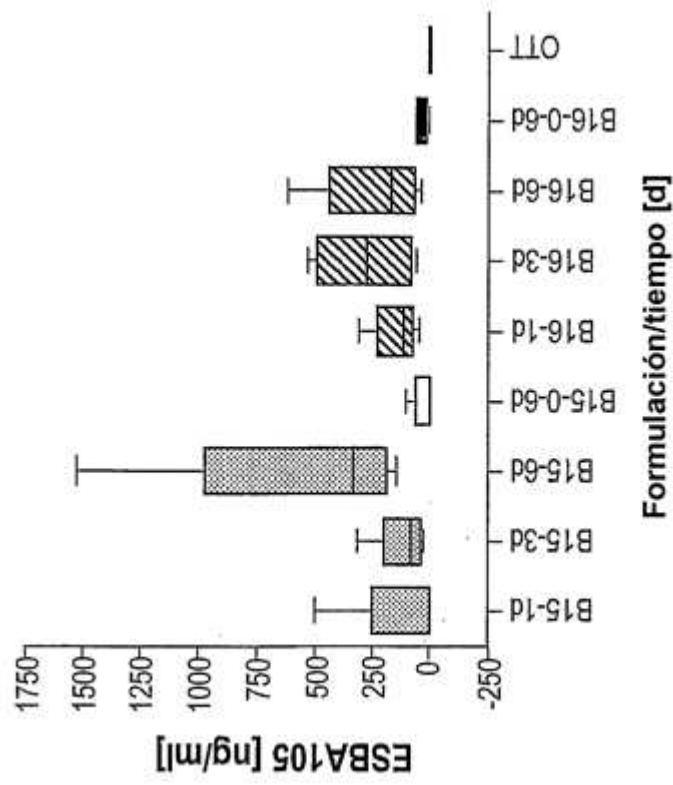


Fig. 11b

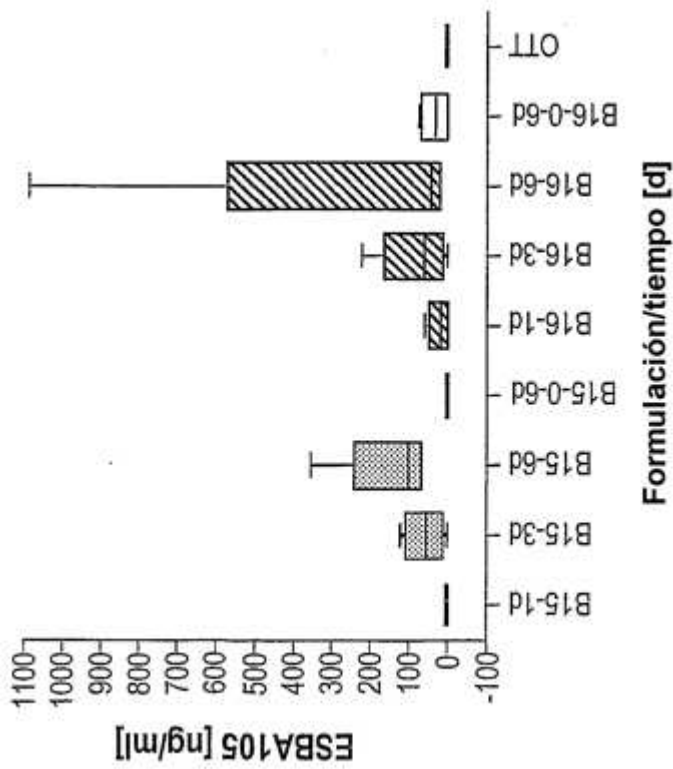


Fig. 11a

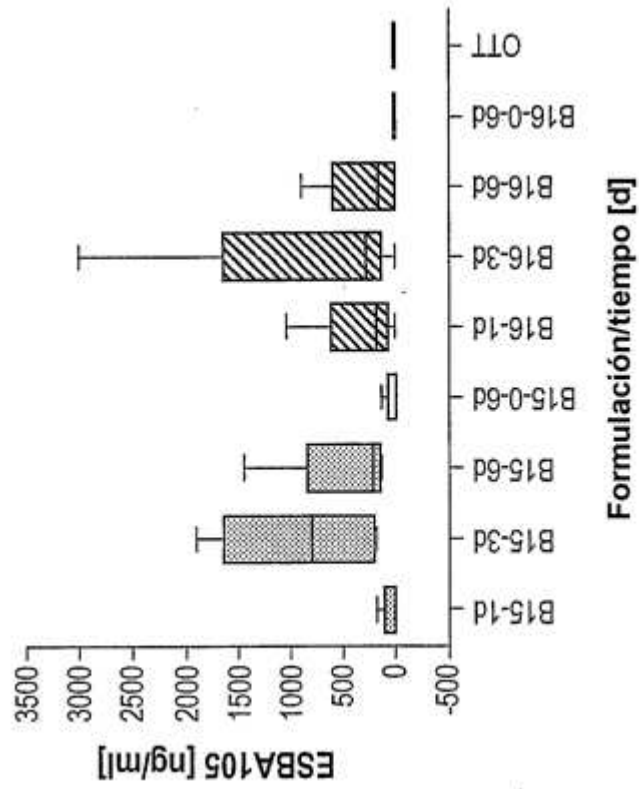


Fig. 11c

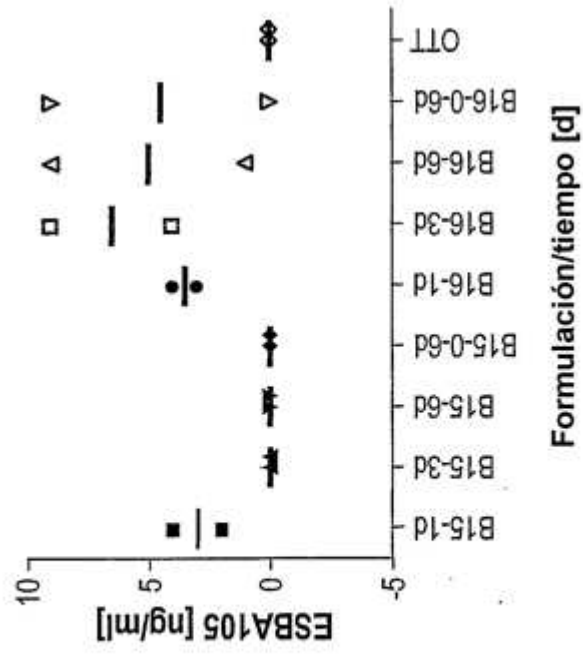


Fig. 11d

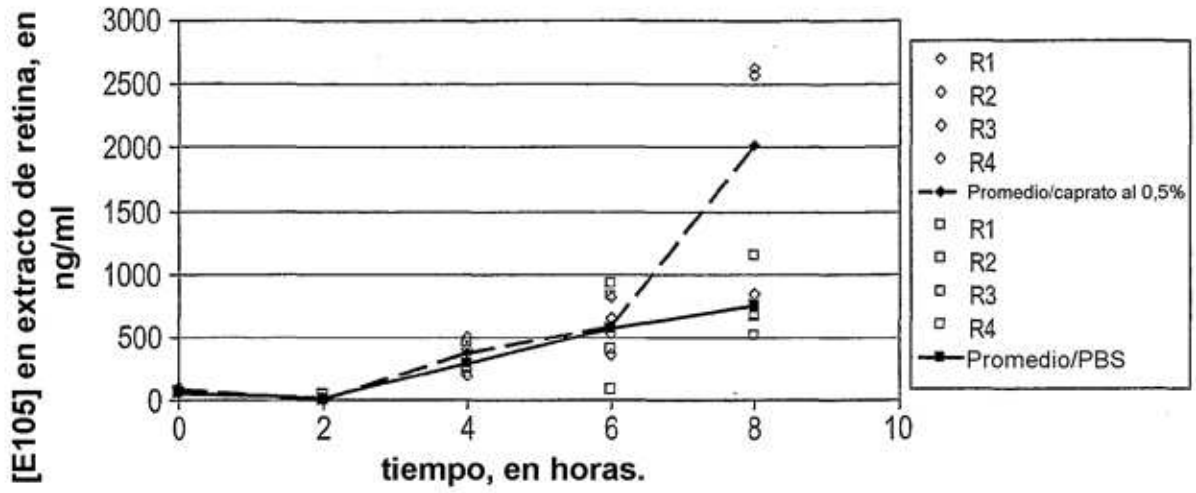


Fig. 12

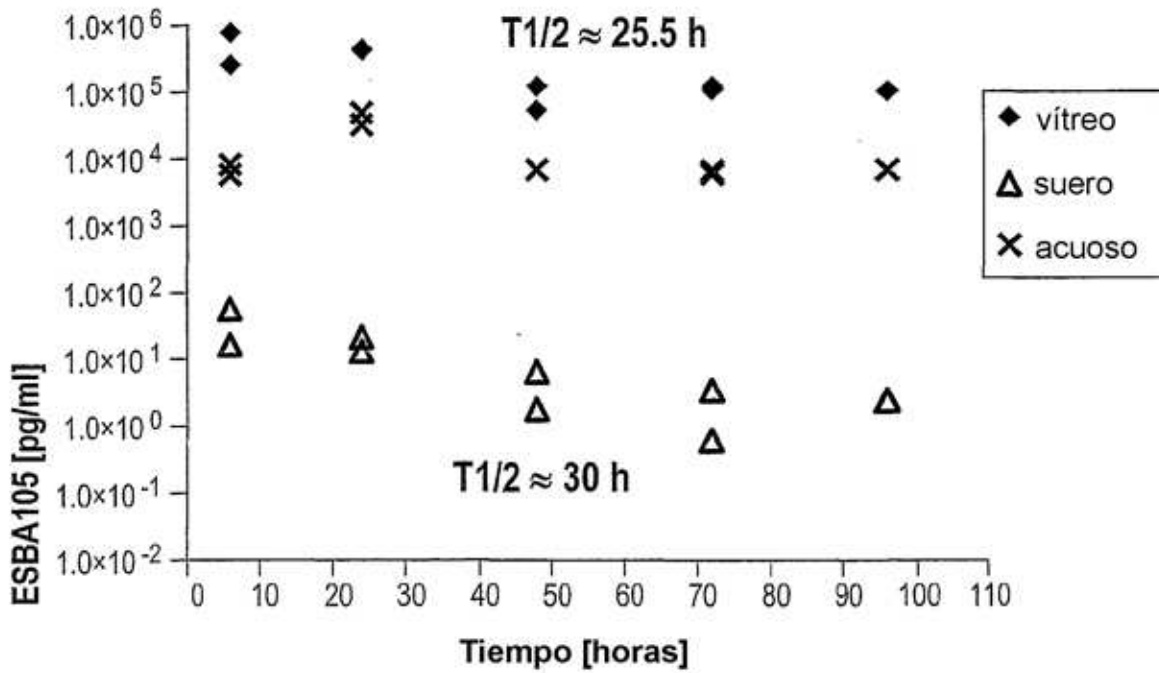
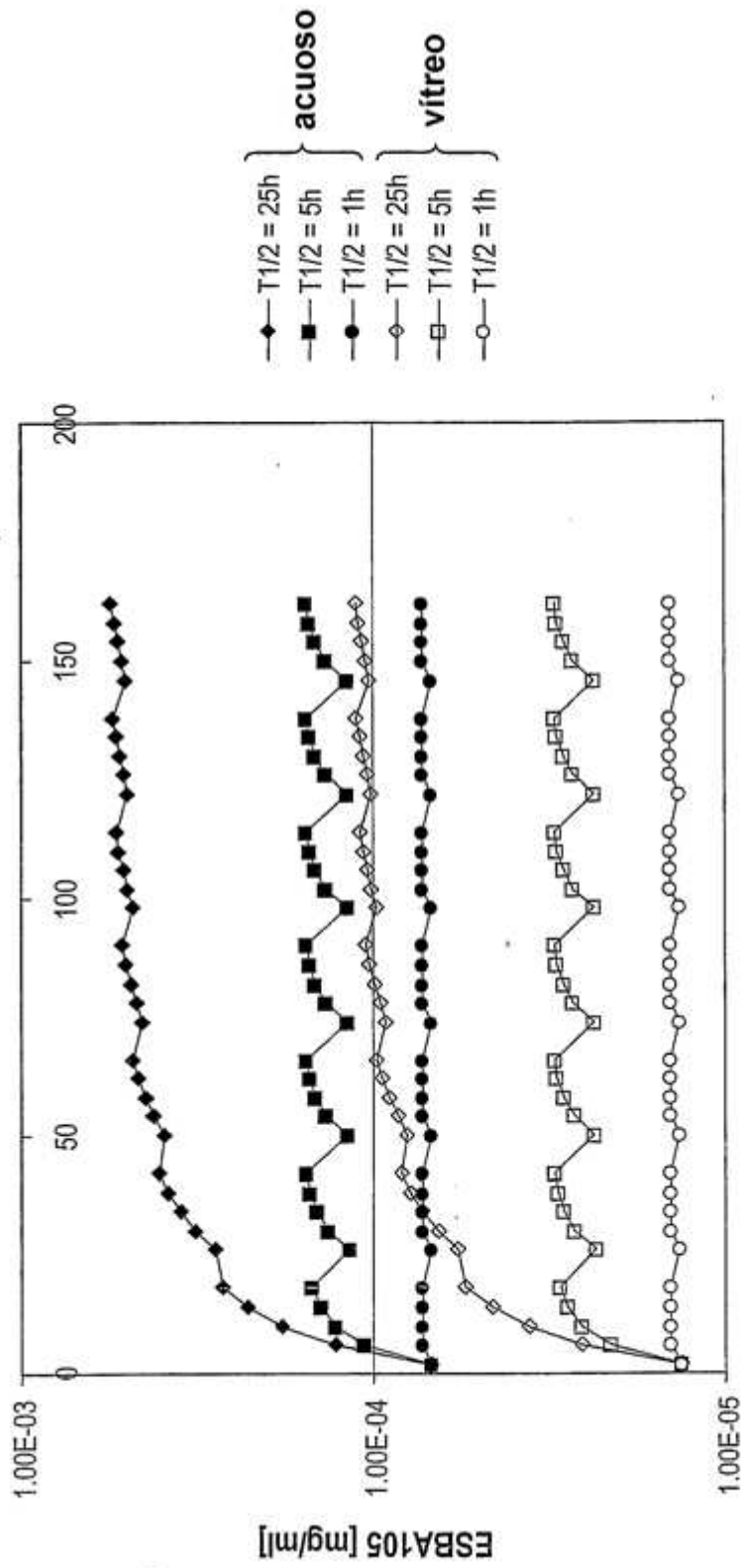


Fig. 13



Tiempo [h]

Fig. 14

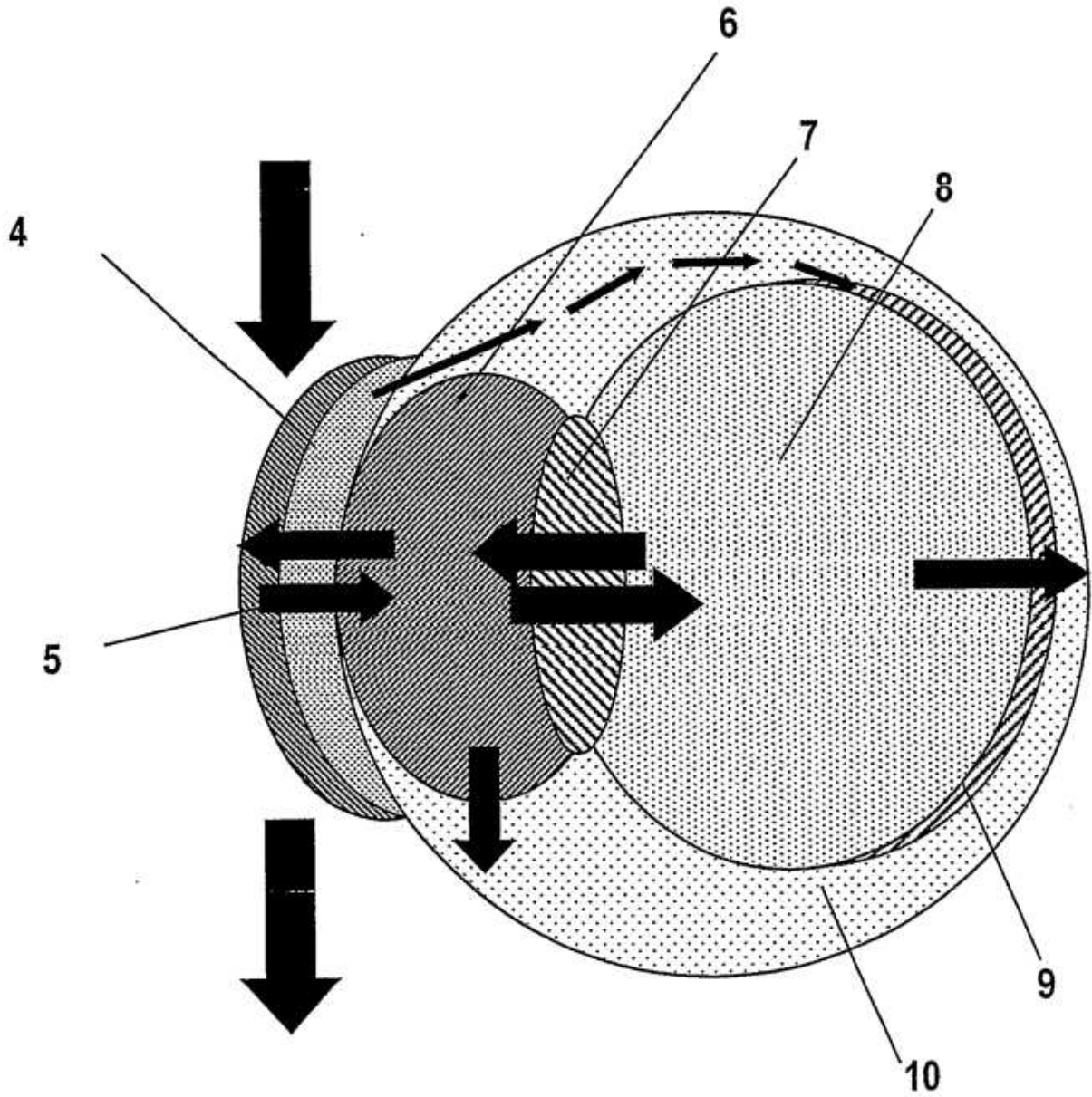


Fig. 15

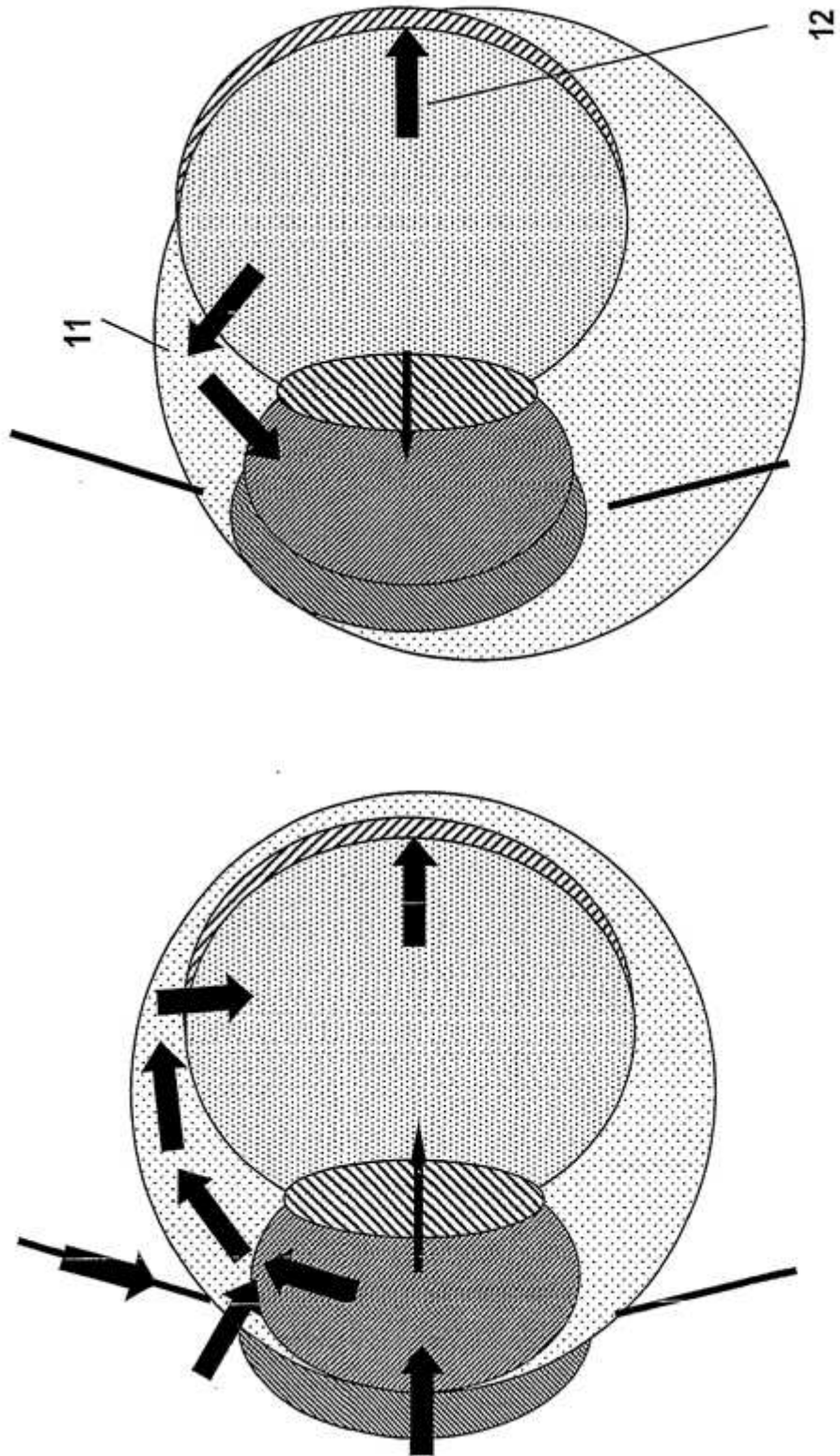


Fig. 16

Fig. 17

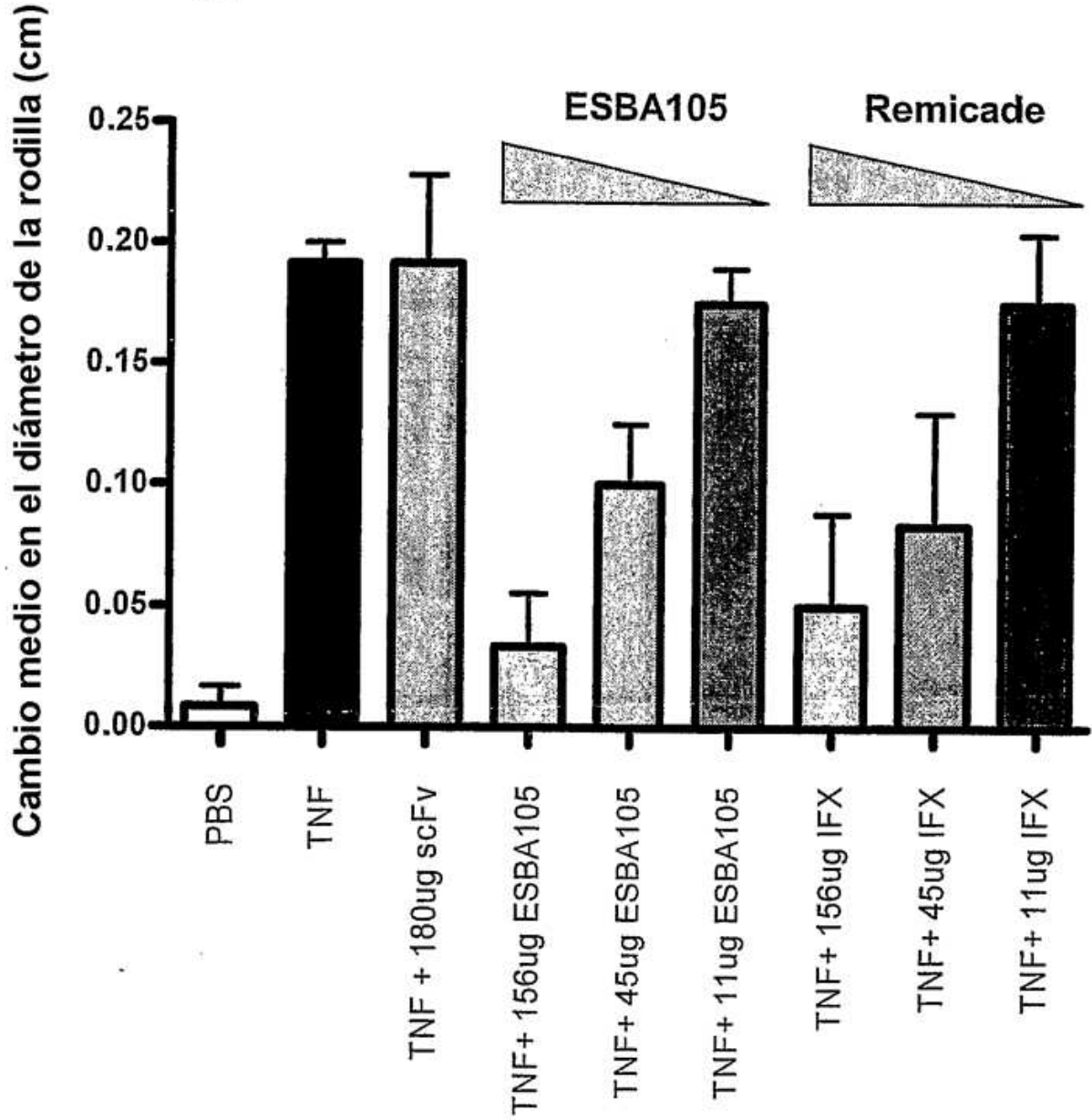


Fig. 18 A

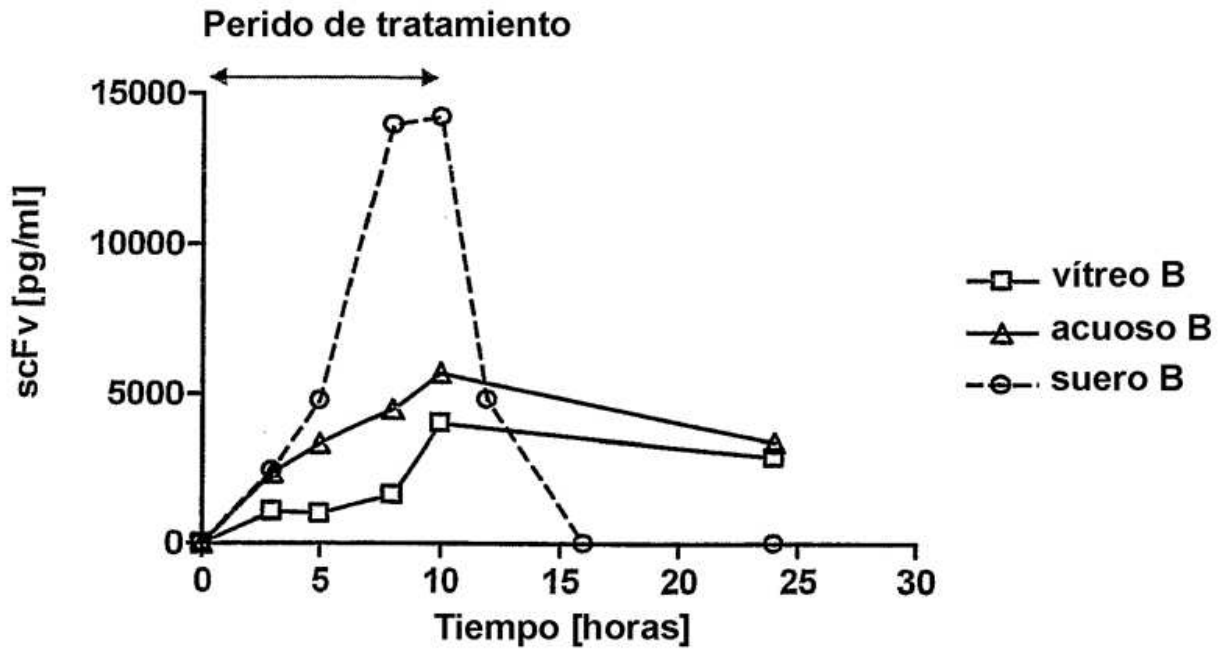


Fig. 19 A

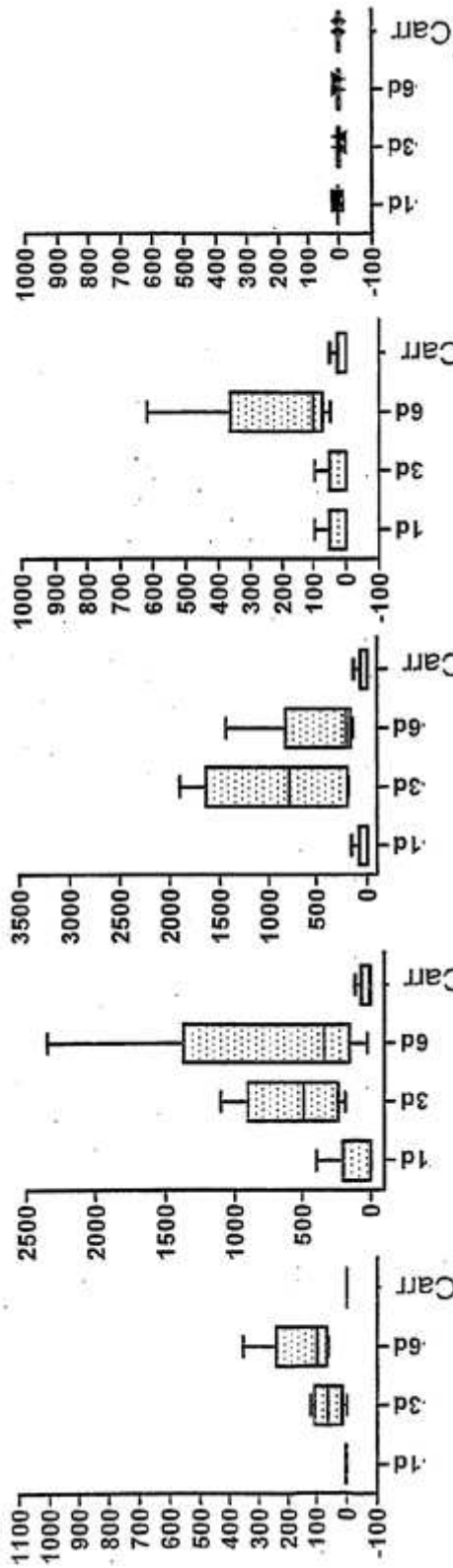


Fig. 19 B

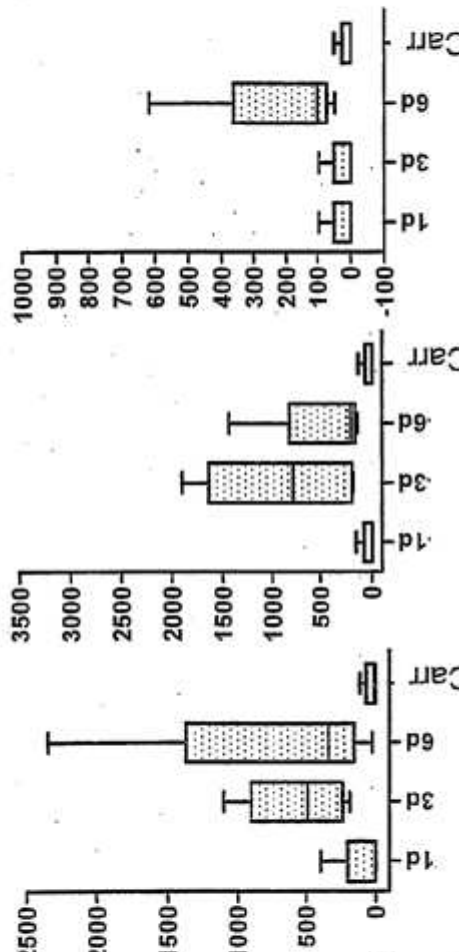


Fig. 19 C

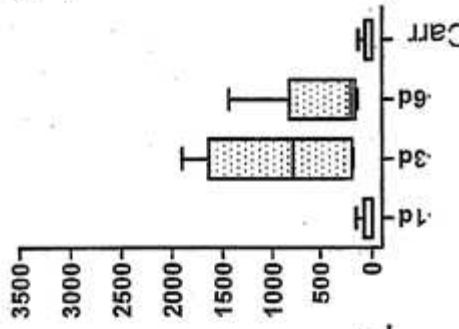


Fig. 19 D

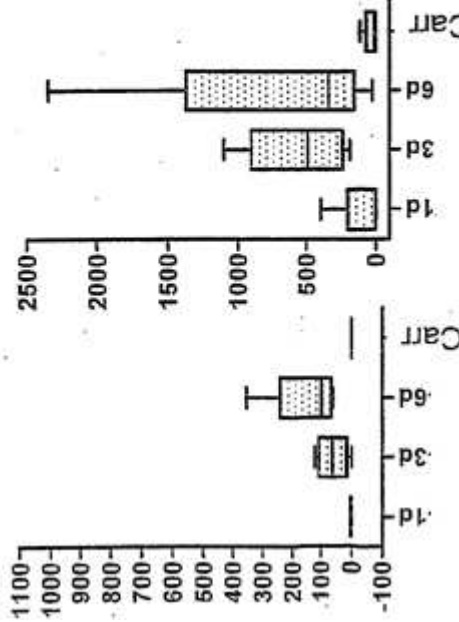


Fig. 19 E

