

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 820 837**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2007 E 16175728 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020 EP 3093026**

54 Título: **Anticuerpos scFv que pasan las capas epitelial y/o endotelial**

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:
22.04.2021

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 2 820 837 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 pasan las capas epitelial y/o endotelial

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo scFv con características mejoradas para la penetración tisular 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 dicho antígeno seleccionado y lo inactiva.

10 Antecedentes de la invención

El tratamiento local de muchas enfermedades se puede producir mediante la aplicación tópica de un fármaco que debe ser capaz de penetrar en el tejido epitelial. Las células epiteliales adyacentes están selladas por uniones herméticas, lo que evita el paso de la mayoría de moléculas disueltas de un lado de la lámina epitelial al otro (Alberts *et al.*, Molecular Biology of the Cell, 2.^a ed.). Las uniones herméticas son cruciales para la formación y el mantenimiento de la barrera paracelular y para la polaridad celular en el epitelio y endotelio simples. También desempeñan una función importante en la barrera hematoencefálica, donde controlan las sustancias que entran o abandonan el cerebro. Los fármacos de peso molecular elevado necesitan pasar estas barreras tisulares con el fin de alcanzar sus sitios de acción. En general, los anticuerpos son demasiado grandes para cruzar las uniones herméticas de las capas de células epiteliales.

Como parte de la actividad corporal normal, las uniones herméticas se abren y cierran selectivamente en respuesta a diversas señales tanto dentro como fuera de las células. Esto permite el paso de moléculas mayores o incluso células completas a través de la barrera de la unión hermética.

La administración en la mucosa de los compuestos terapéuticos puede ofrecer ciertas ventajas respecto a la inyección y otros modos de administración, por ejemplo, en lo que se refiere a la comodidad y velocidad de suministro, así como también a la reducción o eliminación de los problemas de adhesión al tratamiento y efectos secundarios que se presentan con el suministro por inyección. Sin embargo, el suministro en la mucosa de agentes con actividad biológica está limitado por las funciones de la barrera mucosa y otros factores. Por estas razones, la administración de fármacos en la mucosa requiere normalmente cantidades más grandes de fármaco que la administración por inyección. Otros compuestos terapéuticos, incluidas proteínas, péptidos y fármacos de peso molecular elevado son a menudo resistentes al suministro en la mucosa.

La capacidad de los fármacos para penetrar en las superficies mucosas, sin ayuda de agentes que mejoran el suministro, parece estar relacionada con varios factores, incluidos el tamaño molecular, solubilidad lipídica e ionización. Las moléculas de bajo peso molecular, menos de aproximadamente 300-100 daltons, son a menudo capaces de penetrar en las barreras mucosas, sin embargo, al aumentar el tamaño molecular, la permeabilidad disminuye rápidamente. Los compuestos solubles en lípidos son por lo general más permeables respecto a las superficies mucosas que las moléculas no solubles en lípidos. Los péptidos y las proteínas son poco solubles en lípidos, y por lo tanto, muestran unas características de absorción a través de las superficies mucosas deficientes.

El documento US2006062758 proporciona composiciones y métodos que incluyen un agente con actividad biológica y un péptido permeabilizante eficaz para potenciar el suministro en la mucosa del agente con actividad biológica a un sujeto mamífero. El péptido permeabilizante potencia de manera reversible el transporte paracelular epitelial en la mucosa, normalmente modulando la estructura y/o fisiología de las uniones epiteliales en una superficie epitelial mucosa en el sujeto.

Previamente, se han descrito péptidos capaces de modular la función de las uniones herméticas epiteliales (Johnson, P. H. y Quay, S. C., 2000). El documento CA2379661 proporciona un sistema de suministro de fármacos paracelular que comprende un péptido derivado de Claudina-6. Las claudinas representan una superfamilia de proteínas de membrana integrales ubicadas en las uniones herméticas y que proporcionan la función de barrera.

Los anticuerpos son herramientas potentes para la investigación bioquímica y en biología molecular y se aplican ampliamente en los diagnósticos médicos y terapia debido a su capacidad de unirse específicamente a su antígeno con afinidad elevada. Normalmente, los anticuerpos están constituidos por dos cadenas pesadas y dos ligeras, que están ligadas covalentemente entre sí mediante enlaces disulfuro. Un dominio sumamente variable que comprende tres regiones complementarias (CDR, por sus siglas en inglés) se ubica en el extremo N de cada cadena. De manera conjunta, las regiones variables de la cadena pesada y ligera determinan la especificidad antigénica del anticuerpo. Se han modificado anticuerpos monocatenarios (scFv) uniendo las secuencias de ADN que codifican los dominios pesado variable (VH) y ligero variable (VL) con una secuencia espaciadora que codifica un conector aminoacídico flexible (Bird *et al.*, 1988).

Este formato presenta ventajas respecto a los anticuerpos completos convencionales en el sentido de que un scFv está codificado por un único gen, se pueden introducir mutaciones fácilmente y el scFv resultante se puede expresar en sistemas de levaduras y procariotas, lo que permite una rápida selección de adherentes específicos con afinidad elevada por virtualmente cualquier epítipo mediante biología molecular simple. Debido a la ausencia de la función efectora, los anticuerpos scFv no ejercen efectos tóxicos mediante la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos o dependiente del complemento (ADCC o CDCC, respectivamente, respectivamente) y a diferencia de los anticuerpos completos, los anticuerpos scFv muestran una buena capacidad de penetración en el tejido.

Se han generado muchos anticuerpos monocatenarios (scFv) contra multitud de antígenos diferentes, en particular, porque se pueden seleccionar fácilmente por su capacidad de unión elevada utilizando técnicas tales como la presentación en fagos o la presentación en ribosomas. Además, se pueden producir los anticuerpos scFv en sistemas microbianos que están asociados con un coste menor en comparación con la producción de los anticuerpos completos terapéuticos.

Además de las aplicaciones *in vitro* extracelulares convencionales, también se han utilizado los scFv con éxito para aplicaciones intracelulares (Wörn *et al.* 2000; Auf der Maur *et al.* 2002; Stocks MR, 2004); así pues, se han desarrollado scFv dirigidos contra antígenos intracelulares. En general, la expresión intracelular de scFv funcional está limitada por su inestabilidad, insolubilidad y tendencia a formar agregados. Por esta razón, se han desarrollado con éxito sistemas de cribado *in vivo* de anticuerpos scFv, que son especialmente solubles y estables en condiciones reductoras típicas del entorno intracelular (por ejemplo, núcleo, citoplasma), utilizando un denominado cribado de «control de calidad» (WO0148017; Auf der Maur *et al.* (2001); Auf der Maur *et al.*, 2004) y han dado lugar a la identificación de secuencias de armazón de scFv especialmente estables y solubles para tales fines (WO03097697). Además estos elementos de armazón muestran niveles de expresión excepcionales y propiedades mejoradas de estabilidad y solubilidad también en condiciones oxidantes, naturales en el entorno extracelular. Así pues, estas propiedades biofísicas y bioquímicas favorables se traducen en rendimientos de producción elevada favorables y permiten que estos fragmentos de anticuerpo, una vez dirigidos contra antígenos específicos, se apliquen de manera local y/o sistémica como agentes 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 los tejidos, y en particular las barreras del tejido epitelial.

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

Uveítis anterior

La uveítis es una inflamación crónica y aguda de la úvea con una prevalencia de un 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 en uveítis posterior seguida por complicaciones tales como cataratas, retinitis e incluso ceguera, si se deja sin tratar (Kok y Lightman 2004). En los individuos <65 años hay tantas personas legalmente ciegas debido a la uveítis como a la retinopatía diabética (Kok y Lightman 2004). La uveítis anterior, como la forma más común de las enfermedades inflamatorias intraoculares, está asociada con el alelo B27 del *locus* A de histocompatibilidad (HLA-B27) en un 50% de los casos (Power *et al.* 1998). De estos pacientes, solo aproximadamente la mitad padece una enfermedad sistémica adicional tal como espondilitis anquilosante o enfermedad intestinal inflamatoria (El-Shabrawi y Hermann 2002). El tratamiento de la uveítis tiene como objetivo principalmente controlar el proceso inflamatorio (Kok y Lightman 2004). En la actualidad, los corticosteroides son el pilar de la terapia de la uveítis (Kok y Lightman 2004). Notablemente, el tratamiento local y sistémico con corticosteroides aumenta significativamente el riesgo de glaucoma y cataratas, lo que limita, por lo tanto, su uso repetido (El-Shabrawi y Hermann 2002). Otros tratamientos que incluyen el metotrexato, ciclosporina o azatioprina requieren como mínimo 6 semanas de tratamiento para producir un efecto, lo que deja a los pacientes con una enorme restricción en su calidad de vida durante un periodo prolongado (El-Shabrawi y Hermann 2002, Dick *et al.* 1997).

A partir de lo expuesto anteriormente, resulta obvio que hay una necesidad médica definida claramente. Los corticosteroides tópicos como la opción terapéutica más común tienen efectos secundarios significativos, los que, de hecho, exacerba el riesgo a largo plazo de ceguera.

Recientemente, se han detectado 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 estudios clínicos pequeños realizados con inhibidores de TNF α aplicados de manera sistémica mencionaron una «mejora inmediata» (El-Shabrawi y Hermann 2002) o «mejora clínica notable en un plazo de días» (Murphy *et al.* 2004) o «en un plazo de 2 semanas» (Joseph 2003) o «mejora significativa después de la primera dosis de infliximab» (Benitez Del Castillo *et al.* 2004).

Por lo tanto, la idea de actuar sobre TNF α está muy validada desde el punto de vista clínico. Sin embargo, sigue habiendo preocupaciones sobre su seguridad en relación con la aplicación sistémica de inhibidores de TNF α y no

estaría justificado su uso en la fracción significativa de pacientes con uveítis que carecen de manifestaciones sistémicas adicionales de la enfermedad.

5 Por lo tanto, un inhibidor de TNF α tópico cubriría una necesidad médica bien definida, especialmente en pacientes con uveítis anterior. Debido a su peso molecular elevado, los inhibidores de TNF α comercializados no se pueden aplicar 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 clásicamente por ataques inflamatorios oculares agresivos episódicos, úlceras orogenitales y lesiones en la piel. En casos raros y graves de la enfermedad de Behçet, también se puede observar además afectación articular, audio-vestibular, torácica, gastrointestinal, cardiovascular, renal o del SNC. El ojo es el órgano interno afectado con más asiduidad en la enfermedad de Behçet y es la causa principal de morbilidad crónica en los pacientes. La enfermedad ocular consiste en iridoclititis unilateral (20%) o bilateral (80%), hipopión o panuveítis con una evolución crónica y recurrente. En general, las exacerbaciones iniciales tienden a ser principalmente anteriores y unilaterales, mientras que los ataques posteriores tienden a afectar la cavidad vítrea y segmento posterior del ojo, y se convierten en bilaterales (Evereklioglu 2005). La uveítis grave se observa con más asiduidad entre pacientes de regiones endémicas tales como pacientes japoneses y turcos, donde afecta a un 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 y alcanza un cuarto de los casos en 10 años. Además, la ceguera legal es significativa y a la larga aparece en más de un 50% de los casos en países con una prevalencia y gravedad elevadas de la enfermedad, tales como Japón (Boyd *et al.*, 2001; Evereklioglu 2005).

25 La enfermedad de Behçet muestra una variación geográfica distintiva y es endémicamente superior particularmente en Japón, Corea, Arabia Saudí, Irán y Turquía así como también en países a lo largo de la antigua «ruta de la seda», incluidos China e Israel (Bonfioli y Orefice 2005; Evereklioglu 2005). Por ejemplo, la enfermedad de Behçet es responsable de un 20% de los casos de uveítis en Japón y Turquía cuando se compara con tan solo un 0,2% en EE. UU. En los países donde la enfermedad es endémica, es más grave, con una frecuencia más elevada de manifestaciones y complicaciones oculares y es más común en hombres, especialmente hombres adultos jóvenes (Evereklioglu 2005). Esta epidemiología particular parece estar mediada por una combinación de factores genéticos (tales como la 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 está entre 1:10 000 y 1:1000 en los países mediterráneos, Oriente Medio y el Lejano 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 la más elevada es la de las partes septentrionales de Japón; la prevalencia global más elevada con hasta 400 por 100 000 se observa en ciertas partes de Turquía. En EE. UU. hay aproximadamente 15 000 personas con la enfermedad de Behçet (Zierhut *et al.*, 2003; Evereklioglu 2005).

40 Las consecuencias de los ataques inflamatorios oftálmicos son la causa principal de morbilidad crónica en los pacientes con la 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 con corticosteroides en los pacientes se ve limitado por su perfil significativo de efectos secundarios. Además, los corticosteroides raramente inducen remisiones completas en la enfermedad de Behçet ocular, y una fracción significativa de pacientes desarrollan una enfermedad resistente a esteroides con el tiempo (Evereklioglu 2005). En la evolución de la enfermedad, los tratamientos comprenden frecuentemente agentes inmunosupresores tales como azatioprina, metotrexato y ciclosporina A. Sin embargo, ya que estos agentes están asociados con problemas de seguridad cruciales también, hay una necesidad médica bien expresada de una modalidad de tratamiento eficiente, segura y novedosa en esta indicación.

Además de hallazgos epidemiológicos recientes que sugieren que variaciones polimórficas en TNF α están asociadas 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 eventos adversos en los pacientes con uveítis tratados con infliximab es inesperadamente elevada en algunos estudios, lo que limita la posibilidad de aplicar de manera sistémica los antagonistas de TNF α para el tratamiento de esta enfermedad (Rosenbaum 2004; Suhler *et al.*, 2005).

La validación clínica de TNF α como una diana farmacológica sumamente atractiva en la enfermedad de Behçet (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 preocupaciones de seguridad aparentes con la supresión sistémica de TNF α en pacientes con uveítis (Rosenbaum 2004; Suhler *et al.*, 2005) revelan que es necesario desarrollar un antagonista de TNF α para aplicación

tópica para pacientes con la enfermedad de Behçet ocular, especialmente para pacientes con síntomas predominantemente oculares.

Debido a su buena capacidad de penetración en el tejido y su rápido aclaramiento renal, se prefieren los anticuerpos scFv para las aplicaciones tópicas. Además de la carga, hidropaticidad y peso molecular, propiedades tales como la solubilidad, tendencia a la agregación y estabilidad térmica influyen en la capacidad de una molécula para atravesar las barreras del tejido. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo sumamente soluble puede que no sea capaz de penetrar en las barreras epiteliales si forma agregados a temperatura fisiológica de aproximadamente 37 °C. La mutación de un único residuo aminoacídico en el elemento de armazón scFv puede, por un lado, mejorar su solubilidad a temperatura ambiente, y esta mutación puede alterar la estabilidad térmica y, por lo tanto, dar lugar a un desplegamiento parcial y agregación a 37 °C. Tales agregados, debido a su mayor peso molecular, ya no son capaces de pasar a través de las barreras del tejido.

Debido a que la penetración tisular es un factor importante para un suministro eficaz del fármaco, en particular en aplicaciones locales, se necesitan anticuerpos terapéuticos, en particular anticuerpos scFv, con una capacidad de penetración tisular mejorada aparte de características por lo demás deseables de estabilidad elevada y poca antigenicidad. El documento WO00/40262 divulga fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, scFv, como agentes farmacéuticos o herramientas diagnósticas para tratar o diagnosticar, respectivamente, trastornos oculares. Los experimentos de penetración ocular se realizan con concentraciones de 0,2 a 0,25 mg/mL de scFv. Se ha mostrado que un scFv podría penetrar la barrera epitelial de la córnea con una velocidad muy baja en ausencia de potenciadores de la penetración y con velocidades más elevadas en su presencia. Ya que los potenciadores de la penetración pueden tener efectos citotóxicos o provocar alteraciones epiteliales, se necesitan métodos alternativos y/o mejorados para el tratamiento de enfermedades oculares con scFv y fragmentos de estos. En particular, se necesitan anticuerpos para una terapia controlada por administración local con un grado bajo de efectos secundarios, que se pueda administrar con una concentración relativamente elevada.

Compendio de la invención

Así pues, un objeto general de la invención es proporcionar un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo scFv, que se una específicamente a un antígeno seleccionado y que tenga una capacidad de penetración tisular mejorada.

Ahora, con el fin de implementar estos y otros objetos adicionales de la invención, que serán más evidentes según avance la memoria descriptiva, dicho anticuerpo se manifiesta por la característica de que se puede obtener mediante un método que comprende

(i) seleccionar de un conjunto de elementos de armazón solubles y establecer el elemento de armazón que se asemeja más al elemento de armazón de un anticuerpo no humano de una especificidad de unión al antígeno seleccionada,

(ii) proporcionar a dicho elemento de armazón con CDR que se unen a dicho antígeno o mutar el elemento de armazón de dicho anticuerpo no humano para que se acerque a la secuencia de dicha región de armazón soluble y estable,

(iii) estudiar el anticuerpo generado en lo que respecta a la solubilidad y estabilidad, y

(iv) estudiar el anticuerpo generado en lo que respecta a la unión al antígeno.

Opcionalmente, entre los pasos (ii) y (iii) se añade el siguiente paso:

- mutar dicho anticuerpo scFv mediante mutagénesis dirigida al sitio o aleatoria de una o más CDR seleccionadas y/o el elemento de armazón.

La presente invención está definida por las reivindicaciones. En particular, la presente invención proporciona un anticuerpo monocatenario (scFv) representado por la fórmula: Y-L-Z; o Z-L-Y; donde Y es [F1-CDR1-F2-CDR2-F3-CDR3 F4] y Z es [F5-CDR1-F6-CDR2-F7-CDR3 F8]; donde las regiones de armazón (F1-F4) de Y son idénticas en al menos un 85% a las regiones de armazón del elemento de armazón de la cadena ligera humana que se expone en la SEQ ID NO: 1; las regiones de armazón (F5-F8) de Z son idénticas en al menos un 85% a las regiones de armazón del elemento de armazón de la cadena pesada humana que se expone en la SEQ ID NO: 11; las CDR (CDR 1-3) de Y se derivan de una o más CDR donantes humanas capaces de unirse a un antígeno diana; las CDR (CDR 4-6) de Z se derivan de una o más CDR donantes no humanas capaces de unirse al antígeno diana; y L es un conector polipeptídico flexible, donde el anticuerpo monocatenario (scFv) tiene una afinidad de unión por un antígeno diana con una KD de al menos 10E-6 M o inferior y el anticuerpo monocatenario (scFv) es lo suficientemente soluble para atravesar una unión hermética epitelial. La presente invención también proporciona un anticuerpo monocatenario (scFv) que comprende: (A) un dominio variable de la cadena ligera (VL) que tiene tres regiones CDR de VL no humanas y regiones de armazón de VL con una similitud de al menos aproximadamente un 85% con las regiones de armazón de VL de un dominio variable de la cadena ligera seleccionadas del grupo que consiste en: las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7; y (b) un dominio variable de la cadena pesada (VH) que tiene tres regiones CDR de VH no humanas y

regiones de armazón de VH con una similitud de al menos aproximadamente un 85% con las regiones de armazón de VH de un dominio variable de la cadena pesada seleccionadas del grupo que consiste en: las SEQ ID NOs: 8, 9, 10 y 11, donde dicho anticuerpo monocatenario (scFv) es capaz de cruzar una córnea de mamífero intacta en menos de 8 horas en ausencia de un potenciador de la penetración.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monocatenario (scFv), una molécula polinucleotídica aislada que codifica el anticuerpo monocatenario (scFv), un vector de clonación o expresión que comprende la dicha molécula polinucleotídica aislada, y una célula hospedadora transformada con el dicho vector de expresión.

En la presente se divulga una composición que comprende un polipéptido de unión al antígeno soluble, donde el polipéptido de unión al antígeno es capaz de cruzar una o más capas epiteliales, por ejemplo, una capa endotelial o capa mesotelial, en menos de aproximadamente 8 horas. Por ejemplo, el polipéptido de unión al antígeno es capaz de cruzar una o más capas epiteliales en menos de aproximadamente 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o menos horas. En un aspecto, el polipéptido de unión al antígeno es capaz de cruzar una capa o capas epiteliales en menos de aproximadamente 4 horas. Se debe entender que se pretende que todos los valores e intervalos entre estos valores e intervalos estén englobados por la presente invención.

En otros aspectos, la capa epitelial es del ojo, por ejemplo, de la córnea, por ejemplo, el epitelio y/o endotelio de la córnea. En un aspecto, la capa epitelial es del intestino. En otro aspecto más, la capa epitelial es de la barrera hematoencefálica.

En otros aspectos más, el polipéptido de unión al antígeno es capaz de cruzar una córnea de mamífero intacta en menos de aproximadamente 8 horas. Por ejemplo, el polipéptido de unión al antígeno es capaz de cruzar una córnea de mamífero intacta en menos de aproximadamente 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o menos horas. En un aspecto, el polipéptido de unión al antígeno es capaz de cruzar una córnea humana intacta. En un aspecto, el polipéptido de unión al antígeno es capaz de cruzar una córnea de cerdo o conejo intacta.

La composición puede comprender además un potenciador de la penetración. En ciertos aspectos, 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 decametanio, desoxicolato, dextransulfato, EDTA, edetato de disodio, etanol, fusidato, glicocolato, laurilsulfato, L- α -lisofosfatidilcolina, metazolamida, N-laurilsarcosina, NMP, ácido oleico, Pz-péptido, fosfolípidos, éter laurílico de polioxietileno-9, saponina, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, taurocolato y taurodesoxicolato. En otro aspecto, el potenciador de la penetración es caprato de sodio. En otro aspecto más, el potenciador de la penetración incluye sistemas coloidales, poliacrilatos y polímero bioadhesivo.

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

En algunos aspectos, el polipéptido tiene una afinidad de unión por un antígeno diana con una kD de al menos 10E-6 o mejor.

En algunos aspectos, la composición divulgada en la presente tiene un pH inferior a aproximadamente 8, donde el polipéptido de unión al antígeno (por ejemplo, anticuerpo monocatenario) es lo suficientemente soluble para atravesar una córnea intacta. En algunos aspectos, la composición tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 6 a aproximadamente 8. En otros aspectos, la composición tiene un pH de aproximadamente 6, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 o cualquier valor incremental de estos. Se entiende que se pretende que cualesquiera valores e intervalos entre estos valores e intervalos estén englobados por la presente invención.

En algunos aspectos, la composición divulgada en la presente se formula a aproximadamente pH 8 o inferior y comprende un polipéptido de unión al antígeno soluble, donde el polipéptido de unión al antígeno es lo suficientemente soluble para atravesar una córnea intacta en menos de aproximadamente 8 horas. En algunos aspectos, el polipéptido de unión al antígeno es lo suficientemente soluble para atravesar una córnea intacta en menos de aproximadamente 4 horas. En otros aspectos, la composición comprende además un agente potenciador de la penetración. En algunos aspectos, el agente 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, DMSO, bromuro de decametanio, desoxicolato, dextransulfato, EDTA, edetato de disodio, etanol, fusidato, glicocolato, laurilsulfato, L- α -lisofosfatidilcolina, N-laurilsarcosina, NMP, ácido oleico, fosfolípidos, éter laurílico de polioxietileno-9, saponina, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, taurocolato y taurodesoxicolato. En algunos aspectos, el agente potenciador de la penetración es caprato de sodio. En algunos aspectos, el agente potenciador de la penetración es clorhexidina.

- En algunos aspectos, el polipéptido de unión al antígeno es capaz de cruzar una o más capas de una córnea intacta en menos de aproximadamente 8 horas. En otros aspectos, la composición divulgada en la presente comprende el polipéptido de unión al antígeno (por ejemplo, anticuerpo monocatenario) con una concentración de más de aproximadamente 2,5 mg/mL, donde el polipéptido es lo suficientemente soluble para atravesar una córnea intacta en menos de aproximadamente 8 horas. La composición puede comprender el polipéptido de unión al antígeno con una concentración en el intervalo de más de aproximadamente 2,5 mg/mL a más de aproximadamente 10,0 mg/mL. Por ejemplo, la composición puede comprender el polipéptido de unión al antígeno en 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 más de aproximadamente 10,0 mg/mL, o cualquier valor incremental de estos. Se debe entender que se pretende que todos los valores e intervalos entre estos valores e intervalos estén englobados por la presente invención. En algunos aspectos, el polipéptido de unión al antígeno está en una concentración de más de aproximadamente 4,0 mg/mL. En otros aspectos, el polipéptido de unión al antígeno está en una concentración de más de aproximadamente 10,0 mg/mL.
- En otros aspectos más, el polipéptido de unión al antígeno es lo suficientemente soluble para atravesar una córnea intacta en menos de aproximadamente 4 horas. En otros aspectos, la composición comprende además un agente potenciador de la penetración. En algunos aspectos, el agente 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, DMSO, bromuro de decametONIO, desoxicolato, dextransulfato, EDTA, edetato de disodio, etanol, fusidato, glicocolato, laurilsulfato, L- α -lisofosfatidilcolina, N-laurilsarcosina, NMP, ácido oleico, fosfolípidos, éter laurílico de polioxietileno-9, saponina, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, taurocolato y taurodesoxicolato. En algunos aspectos, el agente potenciador de la penetración es caprato de sodio. En otros aspectos, el agente potenciador de la penetración es clorhexidina.
- En algunos aspectos, el polipéptido de unión al antígeno (por ejemplo, anticuerpo monocatenario), tiene una afinidad de unión por un antígeno diana con una kD de al menos $10E-6$ M y es lo suficientemente soluble para atravesar una unión hermética epitelial, y sigue estando en forma monomérica en condiciones fisiológicas.
- En otros aspectos, el polipéptido de unión al antígeno es estable a una temperatura de aproximadamente -80 grados Celsius a aproximadamente 37 grados Celsius. Por ejemplo, la composición puede ser estable a una temperatura de -80 grados Celsius, -70 grados Celsius, -60 grados Celsius, -50 grados Celsius, -40 grados Celsius, -30 grados Celsius, -20 grados Celsius, -10 grados Celsius, 0 grados Celsius, 10 grados Celsius, 20 grados Celsius o 30 grados Celsius, o cualquier valor incremental de estos. Se debe entender que se pretende que todos los valores e intervalos entre estos valores e intervalos estén englobados por la presente invención. En algunos aspectos, el polipéptido de unión al antígeno sigue siendo estable durante al menos aproximadamente ocho semanas. En otros aspectos, el polipéptido de unión al antígeno sigue siendo estable durante al menos seis semanas a 4 grados Celsius.
- En algunos aspectos, el polipéptido de unión al antígeno tiene las características farmacodinámicas o farmacocinéticas que se muestran experimentalmente a lo largo de cualquiera de las figuras divulgadas en la presente.
- En otros aspectos, el polipéptido de unión al antígeno tiene una afinidad de unión por un antígeno diana con una kD de al menos $10E-6$ M o mejor y es lo suficientemente soluble para atravesar una unión hermética epitelial en menos de 8 horas. En algunos aspectos, el polipéptido de unión al antígeno es lo suficientemente soluble para cruzar una unión hermética epitelial en aproximadamente 4 horas o menos.
- En otros aspectos más, el polipéptido de unión al antígeno tiene una afinidad de unión por un antígeno diana con una kD de al menos $10E-6$ M o mejor y tiene un valor de $\frac{1}{2} V_{m\acute{a}x}$ correspondiente a la cinética de tránsito de un polipéptido de unión al antígeno que puede cruzar una unión hermética epitelial en menos de aproximadamente 8 horas.
- En otros aspectos, el polipéptido de unión al antígeno es lo suficientemente soluble para atravesar una unión hermética epitelial según se mide en un ensayo de monocapa de células epiteliales Caco-2 (adenocarcinoma de colon humano) estándar, como para ser adecuado para su uso en terapia. En diversos aspectos, el polipéptido de unión al antígeno es lo suficientemente soluble para atravesar una unión hermética epitelial según se mide en un ensayo de permeabilidad de yeyuno de ratón estándar, como para ser adecuado para su uso en terapia. En otros aspectos más, el polipéptido de unión al antígeno es lo suficientemente soluble para atravesar una unión hermética epitelial según se mide en ensayos de solubilidad de un híbrido o dos híbridos intracelulares estándar, como para ser adecuado para su uso en terapia. En otros aspectos más adicionales, el polipéptido de unión al antígeno es lo suficientemente soluble para atravesar una unión hermética epitelial según se mide en un ensayo de precipitación con PEG o ensayo de cromatografía de autointeracción (SIC, por sus siglas en inglés), como para ser adecuado para su uso en terapia.
- En la presente también se divulga un método para identificar un polipéptido de unión al antígeno que tiene un valor de $\frac{1}{2} V_{m\acute{a}x}$ correspondiente al tránsito del polipéptido de unión al antígeno a través de una unión hermética epitelial en menos de aproximadamente 8 horas. El método comprende: expresar intracelularmente los polipéptidos de unión al antígeno candidatos en células hospedadoras que tienen un sistema génico indicador inducible, donde el sistema

génico indicador genera una señal registrable cuando está en presencia de un polipéptido de unión al antígeno que tiene dicha cinética de tránsito; y cribar dichas células para detectar una señal registrable, donde la presencia de dicha señal identifica a un polipéptido candidato como un polipéptido de unión al antígeno que tiene dicha cinética de tránsito. También se divulga en la presente un polipéptido de unión al antígeno identificado por este método. También se divulga en la presente un kit para llevar a cabo este método.

Además, se describe en la presente el tratamiento de un paciente con una afección ocular mediante la administración tópica de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de unión al antígeno divulgado en la presente, de modo que se consiga el tratamiento. La afección ocular puede ser uveítis o degeneración macular senil.

Además, se describe en la presente un polipéptido de unión al antígeno que comprende una región polipeptídica que tiene al menos un motivo de unión al antígeno flanqueado por al menos una región de esqueleto y donde el polipéptido tiene una cinética de tránsito suficiente para cruzar una unión hermética epitelial en menos de aproximadamente 8 horas. El polipéptido puede comprender un motivo de unión al antígeno flanqueado por dos regiones de esqueleto, dos motivos de unión al antígeno flanqueados por tres regiones de esqueleto, tres motivos de unión al antígeno flanqueados por cuatro regiones de esqueleto, o seis motivos de unión al antígeno flanqueados por ocho regiones de esqueleto con una región conectora intercalada entre la cuarta y la quinta regiones de esqueleto. El motivo de unión al antígeno también puede ser una CDR y la región de esqueleto puede ser una región de armazón de inmunoglobulina. El polipéptido también puede comprender tres CDR y cuatro regiones de armazón intercaladas o seis CDR y ocho regiones de armazón y una región conectora intercalada.

En la presente se divulga un polipéptido de unión al antígeno capaz de unirse específicamente a un antígeno diana y que tiene una cinética de tránsito suficiente para cruzar una unión hermética epitelial en menos de aproximadamente 8 horas y donde el polipéptido está representado por la fórmula:

Y; o

Z; o

Y-L-Z; o

Z-L-Y;

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

donde las regiones de armazón (F1-F4) de Y se derivan de uno o más elementos de armazón de la cadena ligera humana; las regiones de armazón (F5-F6) de Z se derivan de uno o más elementos de armazón de la cadena ligera humana; las CDR (CDR 1-3) de Y se derivan de una o más CDR donantes capaces de unirse al antígeno diana; las CDR (CDR 4-6) de Z se derivan de una o más CDR donantes capaces de unirse al antígeno diana; y L es un conector polipeptídico flexible. Y y Z se pueden representar mediante cualquiera de las secuencias divulgadas en la presente, o un consenso de estas.

Como alternativa, las mutaciones se pueden introducir de manera aleatoria de manera aleatoria a lo largo de la totalidad o de parte de la secuencia que codifica el polipéptido de unión al antígeno, tal como por mutagénesis de saturación. Una «secuencia consenso» es una secuencia formada a partir de los aminoácidos (o nucleótidos) que están presentes con mayor frecuencia 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 está presente con mayor frecuencia en esa posición en la familia. Si dos aminoácidos están presentes con igual frecuencia, se puede incluir cualquiera en la secuencia consenso.

En algunos aspectos, el polipéptido de unión al antígeno se formula para conseguir una concentración intraocular de al menos aproximadamente 100 ng/mL o más. En otros aspectos más, el anticuerpo monocatenario se formula para la administración tópica para generar una concentración intraocular de 100 ng/mL o más basándose en un sistema modelo en animales o celular como se divulga en la presente.

En otros aspectos, el polipéptido de unión al antígeno se formula para la aplicación tópica en el ojo y es capaz de pasar a través de la córnea y adentrarse en el espacio intraocular en ausencia de un potenciador de la penetración. En la presente se divulga el tratamiento, prevención o diagnóstico de una enfermedad o trastorno ocular utilizando un polipéptido de unión al antígeno como se describe en la presente.

Descripción breve de los dibujos

La sección anterior y otros aspectos, realizaciones, objetos, características y ventajas de la invención se pueden entender más completamente a partir de la siguiente memoria descriptiva y junto con los dibujos adjuntos. En los

dibujos, los mismos caracteres de referencia se refieren por lo general a las mismas características y elementos estructurales a lo largo de las diversas figuras. Los dibujos no están necesariamente a escala, en su lugar el énfasis se pone en que ilustran los principios de la invención.

- 5 La Figura 1 muestra los perfiles de elución de ESBA105 (Fig. 1A), TB-WT (Fig. 1B) y lucentis-scFv (Fig. 1C) de una cromatografía de exclusión por tamaño preparativa (filtración en gel) tras el paso de replegamiento. mUA: unidades de miliabsorbancia.
- 10 La Figura 2 muestra el perfil de elución de una filtración en gel analítica de las fracciones recogidas con el pico de ESBA105 tras la filtración en gel preparativa.
- La Figura 3 muestra la solubilidad de ESBA105 en polietilenglicol (PEG).
- 15 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. Los anticuerpos se separaron mediante SDS PAGE y se tiñeron con azul brillante de Coomassie.
- 20 La Figura 5 muestra la actividad de ESBA105 determinada mediante el ensayo con L929 después de 8 semanas de almacenamiento a 37 °C o -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 del vítreo y de la cámara anterior, respectivamente. 1 líquido de la cavidad vítrea, 2 líquido del ojo anterior, 3 iris, 4 córnea, 13 jeringa.
- 25 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.
- 30 La Figura 9 muestra la penetración de ESBA105 a través de una capa de células Caco-2.
- La Figura 10 muestra una comparación de las eficacias de penetración de un anticuerpo con formato de IgG completo (Infliximab) y un fragmento de anticuerpo con formato monocatenario (ESBA105) a través del yeyuno de rata en el modelo de saco no evertido de la absorción intestinal del fármaco. Los cuadrados negros indican la concentración de ESBA105 en nM, los círculos blancos la concentración de infliximab en nM.
- 35 La Figura 11a es una descripción gráfica de la cantidad de ESBA105 en ng/mL detectada en muestras del humor acuoso de ojos de conejo obtenidas a lo largo del estudio descrito en el Ejemplo 7.
- 40 La Figura 11b es una descripción gráfica de la cantidad de ESBA105 en ng/mL detectada en muestras del humor vítreo de ojos de conejo obtenidas a lo largo del estudio descrito en el Ejemplo 7.
- La Figura 11c es una descripción gráfica de la cantidad de ESBA105 en ng/mL detectada en muestras de la neurorretina de ojos de conejo obtenidas a lo largo del estudio descrito en el Ejemplo 7.
- 45 La Figura 11d es una descripción gráfica de la cantidad de ESBA105 en ng/mL detectada en muestras del suero de ojos de conejo obtenidas a lo largo del estudio descrito en el Ejemplo 7.
- 50 La Figura 12 es una descripción gráfica del pK *in vitro* local de ESBA105 en ojos de conejo. Extracto de retina ~500 ng/mL. 060721 ELISA (de ojo de conejo completo n.º 060718), Retina.
- La Figura 13 es una descripción gráfica de la semivida local de ESBA105 tras la inyección vítrea en ojos de conejo.
- 55 La Figura 14 describe gráficamente la modelización de la acumulación de fármaco local después de la administración de ESBA105 (5 gotas/día, 10 mg/mL de ESBA105, $P_{\text{eff}} = 2,9 \times 10^{-5}$).
- La Figura 15 es una descripción gráfica del pK del ojo. 4 córnea, 5 película lacrimal, 6 cámara anterior, 7 cristalino, 8 cuerpo vítreo, 9 retina, 10 esclerótica.
- 60 La Figura 16 es una descripción gráfica de las vías de absorción y eliminación de ESBA105. 11 fármacos hidrófilos, 12 fármacos lipófilos.
- La Figura 17 muestra los datos de respuesta a la dosis en un modelo (rata) de monoartritis aguda *in vivo* relevante. n= 3, TNF α : 10 μ g i.a.

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

5 Las gotas se aplicaron en la parte superior de la pupila y posteriormente se presionó en los párpados para eliminar el fluido en exceso (7 mcL restantes). Las concentraciones de ESBA105 se determinaron mediante ELISA en el acuoso, vítreo y suero.

10 La Figura 19 muestra una descripción gráfica de los resultados *in vivo* de la aplicación tópica en ojo de conejo. Se aplicó una gota de una solución de 10 mg/mL de ESBA105 en el saco ocular inferior de ambos ojos de cada animal cinco veces al día durante hasta 6 días.

15 Muestreo: Después de aplicar la segunda gota en el punto temporal indicado (después de 1, 3 o 6 días) se sacrificaron dos animales y se sometieron a análisis por ELISA cuantitativo ambos ojos, así como también el suero. Se determinaron los niveles de ESBA105 en el acuoso (Fig. 19A), en el vítreo (Fig. 19B), en la neurorretina (Fig. 19C), en el coroides (Fig. 19D) y en el suero (Fig. 19E) como se indica.

20 «Port» significa portador, que se refiere a una solución tampón sin ESBA105. Las barras de datos representan las concentraciones máximas, mínimas y mediana de ESBA105 en los compartimentos indicados y se proporcionan junto con las desviaciones estándar respectivas.

Descripción detallada de la invención

25 Con el fin de proporcionar una mejor comprensión de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, a continuación se proporcionan convenientemente las siguientes definiciones.

Definiciones

30 El término «anticuerpo» se refiere a anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión al antígeno (es decir, «porción de unión al antígeno», «polipéptido de unión al antígeno» o «inmunoaderente») o una cadena sencilla de este. Un «anticuerpo» se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión al antígeno de esta. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada en la presente como VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios: CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de la cadena ligera (abreviada en la presente como VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta por un dominio: CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de armazón (FR, por sus siglas en inglés). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del hospedador, incluidas diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

La expresión «unión al antígeno» se refiere a la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo completo. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados por la expresión «porción de unión al 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 ligados por un puente disulfuro en la región de 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 solo brazo de un anticuerpo; (v) un dominio único o fragmento 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 estar unidas opcionalmente por un conector sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH están codificados por genes diferentes, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que les permita ser preparados como una única cadena proteica en la cual las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (que se conocen como Fv monocatenario (scFv); véase, por ejemplo, Bird *et al.*, (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5879-5883). Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se someten a un cribado en función de su utilidad de la misma manera que para los anticuerpos intactos.

65 Tal como se utiliza, «inmunoglobulina» se puede referir a cualquier clase o subclase reconocida de inmunoglobulinas tales como IgG, IgA, IgM, IgD o IgE. La inmunoglobulina se puede obtener de cualquier especie, tal 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, F_v o Fab, u otros fragmentos de inmunoglobulina que reconocen antígenos. Tales fragmentos de inmunoglobulina se pueden preparar, 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 son muy conocidos por 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).

Además, la inmunoglobulina puede ser un anticuerpo monocatenario («SCA», por sus siglas en inglés). Estos pueden estar compuestos por fragmentos F_v monocatenarios («scFv») en los que los dominios ligero variable («VL») y pesado variable («VH») están ligados por un puente peptídico o mediante enlaces disulfuro. Asimismo, la inmunoglobulina puede estar compuesta por dominios monocatenarios VH (dab) que poseen actividad de unión al antígeno. Véase, 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).

Tal como se utiliza en la presente, el término «polipéptido» se refiere a un polímero de dos o más de los aminoácidos naturales o aminoácidos no naturales. Los polipéptidos divulgados en la presente comprenden al menos una secuencia de aminoácidos que procede de una molécula de inmunoglobulina (Ig). En un aspecto, se divulga un polipéptido en la presente que comprende una secuencia de aminoácidos o uno o más restos que no proceden de una molécula de inmunoglobulina. A continuación, se describen en más detalle modificaciones ejemplares. Por ejemplo, en un aspecto, un polipéptido divulgado en la presente puede comprender una secuencia conectora flexible. En otro aspecto, un polipéptido se puede modificar para añadir un resto funcional (por ejemplo, PEG, un fármaco o una marca).

Los polipéptidos preferidos divulgados en la presente comprenden una secuencia de aminoácidos que procede de una secuencia de inmunoglobulina humana. Sin embargo, los polipéptidos pueden comprender uno o más aminoácidos de otra especie de mamífero. Por ejemplo, se puede incluir una porción de cadena pesada de primate, porción de bisagra o sitio de unión en los polipéptidos objeto. Como alternativa, pueden estar presentes uno o más aminoácidos murinos en un polipéptido. Los polipéptidos preferidos divulgados en la presente no son inmunógenos.

El experto en la técnica también entenderá que los polipéptidos divulgados en la presente se pueden alterar de tal manera que varíen en la secuencia de aminoácidos respecto al polipéptido de origen natural o nativo del que proceden, y sigan conservando la actividad deseable del polipéptido nativo. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de nucleótidos o aminoácidos que dan lugar a sustituciones o cambios conservadores en residuos aminoacídicos «no esenciales». Se puede crear una molécula de ácido nucleico aislado que codifica una variante no natural de un polipéptido que procede de una inmunoglobulina (por ejemplo, una porción de la cadena pesada o una porción de la cadena ligera de inmunoglobulina) introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la inmunoglobulina de modo que se introduzcan una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos en la proteína codificada. Se pueden introducir mutaciones mediante técnicas estándar, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR.

Los polipéptidos divulgados en la presente pueden comprender sustituciones de aminoácidos conservadoras en uno o más residuos aminoacídicos no esenciales. Una «sustitución conservadora de aminoácidos» es una en que el residuo aminoacídico se reemplaza con un residuo aminoacídico que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido las familias de residuos aminoacídicos que tienen cadenas laterales similares, que incluyen las cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales con ramificaciones en la posición beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por tanto, un residuo aminoacídico no esencial en el polipéptido se reemplaza preferentemente con otro residuo aminoacídico de la misma familia de cadenas laterales. En otro aspecto, se puede reemplazar una serie de aminoácidos con una serie similar desde un punto de vista estructural que difiere en orden y/o composición de los miembros de la familia de cadenas laterales. Como alternativa, en otro aspecto, se pueden introducir mutaciones aleatoriamente a lo largo de la totalidad o de parte de la secuencia que codifica la inmunoglobulina, tal como mediante mutagénesis por saturación, y los mutantes resultantes se pueden incorporar a los polipéptidos divulgados en la presente y someter a un cribado en función de su capacidad para unirse a la diana deseada.

Los términos «unión específica», «unión selectiva», «se une selectivamente» y «se une específicamente» se refieren a un anticuerpo que se une 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 de aproximadamente menos de 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M o 10⁻⁹ M o incluso menor.

El término «KD» se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción de 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 de menos de aproximadamente 10-7 M, 10-8 M o 10-9 M o incluso menor, por ejemplo, tal como se determina utilizando tecnología de resonancia de plasmones superficiales (SPR, por sus siglas en inglés) en un instrumento BIACORE.

5 La expresión «cinética de tránsito» o «farmacocinética», como se utiliza en la presente, se refiere a todos los factores relacionados con la dinámica de la absorción del fármaco, distribución en fluidos o tejidos corporales y metabolismo y/o eliminación. Esto engloba los factores fisicoquímicos que regulan la transferencia del polipéptido a través de las membranas, debido a que la absorción, distribución, biotransformación y excreción de un polipéptido conllevan todos ellos el paso de polipéptidos a través de membranas celulares.

10 La biodisponibilidad del polipéptido resulta de gran interés para el facultativo. La expresión, como se utiliza en la presente, indica el grado en el que el polipéptido alcanza el sitio de acción o un fluido biológico desde el cual el polipéptido tiene acceso a su sitio de acción. Los factores que afectan a la biodisponibilidad incluyen la tasa de absorción y metabolismo o eliminación del polipéptido del sujeto. Muchos factores afectan a la absorción, estos incluyen numerosos factores fisicoquímicos que afectan al transporte a través de membranas tales como la solubilidad del polipéptido y mecanismos de captación así como también factores tales como el sitio de administración y la formulación (concentración) y composición del polipéptido. Las diversas vías de administración del polipéptido pueden tener características de absorción marcadamente diferentes. Estas vías incluyen la ingesta oral, absorción pulmonar, inyección parenteral, incluidas: inyección intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intratecal o intraperitoneal y aplicación tópica a membranas mucosas, piel u ojo. En una realización preferida, se administra por vía tópica a la superficie del ojo un polipéptido de la invención para tratar una enfermedad ocular, por ejemplo, en forma de gotas oculares. La cinética de tránsito de un polipéptido de la invención se puede determinar utilizando, por ejemplo, cualquiera de las moléculas de animales o células divulgadas en la presente, y se seleccionan normalmente para que sean adecuadas para el tránsito relevante desde un punto de vista clínico a través de las uniones herméticas de la barrera hematoencefálica, intestino o el ojo.

25 El término «sujeto» es conocido en la técnica y, como se utiliza en la presente, se refiere a un animal de sangre caliente, más preferentemente un mamífero, incluidos, por ejemplo, animales no humanos tales como ratas, ratones, conejos, gatos, perros, ovejas, caballos, 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 al antígeno soluble de la presente invención.

35 Un «agente potenciador de la penetración» o «potenciador de la penetración» como se utiliza en la presente se refiere a moléculas o compuestos que promueven el tránsito a través de una unión epitelial. Los agentes potenciadores de la penetración para su uso con la presente invención incluyen, sin carácter limitante, 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, dextran sulfato, EDTA, edetato de sodio, etanol, fusidato, glicocolato, laurilsulfato, L- α -lisofosfatidilcolina, N-laurilsarcosina, NMP, ácido oleico, fosfolípidos, éter laurílico de polioxietileno-9, saponina, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, taurocolato y taurodesoxicolato. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente potenciador de la penetración es caprato de sodio. En otras realizaciones, el agente potenciador de la penetración es clorhexidina.

45 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo scFv que se une específicamente a un antígeno seleccionado y que tiene una capacidad de penetración tisular mejorada. Dicho anticuerpo se caracteriza por que se puede obtener mediante un método que comprende

50 (i) seleccionar de un conjunto de elementos de almacén solubles y estables el elemento de almacén que se asemeja más al elemento de almacén de un anticuerpo no humano de una especificidad de unión al antígeno seleccionada,

(ii) proporcionar a dicho elemento de almacén con CDR que se unen a dicho antígeno o mutar el elemento de almacén de dicho anticuerpo no humano para que se acerque a la secuencia de dicha región de almacén soluble y estable,

55 (iii) estudiar el anticuerpo generado en lo que respecta a la solubilidad y estabilidad, y

(iv) estudiar el anticuerpo generado en lo que respecta a la unión al antígeno.

60 La expresión «que se asemeja más» se refiere a que es tan similar como es posible a una estructura primaria o terciaria.

65 En general, el anticuerpo de la presente invención comprende un elemento de almacén con un dominio VL y/o VH, seleccionándose dicho elemento de almacén a partir de al menos un repertorio de anticuerpos humanos naturales por un método independiente del antígeno en función de una estabilidad y solubilidad intracelulares en una célula de levaduras elevadas. Dicho método también se conoce como el cribado de «control de calidad» de elementos de almacén de anticuerpo y da como resultado una selección de elementos de almacén de anticuerpo especialmente

estables y solubles que se caracterizan por una estabilidad y solubilidad intracelulares elevadas. Estos elementos de armazón se pueden utilizar, por ejemplo, en un segundo sistema con levaduras que criba en función de la especificidad antigénica. En este caso, las CDR de un anticuerpo especialmente estable y soluble se pueden aleatorizar y los anticuerpos resultantes se pueden someter a un cribado para identificar el mejor reconocimiento antigénico posible.

5 Como alternativa, las CDR de anticuerpos conocidos de anticuerpos con una intensa afinidad de unión a un antígeno de elección se pueden injertar en dichos elementos de armazón especialmente estables y solubles. Opcionalmente, dicho anticuerpo se puede mejorar adicionalmente por mutagénesis de CDR(s) y/o elemento de armazón seleccionados, seleccionar los clones mejorados en el «sistema de control de calidad» (WO0148017, Auf der Maur *et al.* 2004), es decir, mutando dicho anticuerpo scFv mediante mutagénesis dirigida al sitio o aleatoria de una o más CDR y/o el elemento de armazón seleccionados y seleccionar los anticuerpos estables y solubles en condiciones idénticas o más rigurosas. La selección se puede realizar *in vivo* en el sistema de control de calidad de levaduras.

15 La expresión «residuos de armazón» se refiere a residuos aminoacídicos de unidades polipeptídicas de unión al antígeno, o los residuos aminoacídicos correspondientes de moléculas polipeptídicas de unión al 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 (o módulo) vecina. Tal contribución puede ser la interacción con otros residuos en la unidad (o módulo), o la influencia en la conformación del esqueleto polipeptídico como se observa en hélices α o láminas β , o series de aminoácidos que forman bucles o polipéptidos lineales. La expresión «residuos de interacción diana» se refiere a residuos aminoacídicos de las unidades, o los residuos aminoacídicos correspondientes de los módulos, que contribuyen a la interacción con las sustancias diana. Tal contribución puede ser la interacción directa con las sustancias diana, o la influencia en otros residuos que interaccionan directamente, por ejemplo, estabilizando la conformación del (poli)péptido de dicha unidad (o módulo) para permitir o potenciar la interacción con dicha diana de dichos residuos que interaccionan directamente. Se pueden identificar tales residuos de interacción diana y de armazón mediante el análisis de los datos estructurales obtenidos mediante los métodos fisicoquímicos mencionados anteriormente, o por comparación con información estructural conocida y relaciona muy conocida por los expertos en biología estructural y/o bioinformática. Tales elementos de armazón también se pueden denominar andamios ya que proporcionan soporte para la presentación de las CDR o residuos de interacción diana más divergentes.

30 Las CDR o residuos de interacción diana se pueden injertar en elementos de armazón adecuados, tales como andamios alternativos que son muy conocidos en la técnica y que incluyen, sin carácter limitante, CTLA-4, tendamistat, fibronectina (FN3), neocarzinostatina, CBM4-2, lipocalinas, receptor de linfocitos T, dominio de la Proteína A (proteína Z), Im9, proteínas con repeticiones de anquirina designadas (DARPs, por sus siglas en inglés), proteínas TPR designadas, dedo de zinc, pVIII, polipéptido pancreático aviar, GCN4, dominio WW, dominio de homología de Src 3 (SH3), dominio de homología de Src 2 (SH2), dominios PDZ, β -lactamasa TEM-1, GFP, tiorredoxina, nucleasa estafilocócica, dedo de PHD, CI-2, BPT1 APPI, HPSTI, ecotina, LACI-D1, LDTI, MTI-II, toxinas de escorpión, péptido de defensina A de insectos, EETI-II, Min-23, CBD, PBP, citocromo b_{562} , dominio A del receptor de Ldl, γ -cristalina, ubiquitina, transferrina, y domino similar a lectina de tipo C (véase Binz *et al.* (2005 Oct) *Nat Biotech* 23(10):1257-68), o en elementos de armazón adecuados de polipéptidos de unión al antígeno procedentes de inmunoglobulina que son muy conocidos en la técnica e incluyen, sin carácter limitante, 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), pp. 1126-1136).

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

50 - es estable en condiciones reductoras según se mide en un ensayo de interacción en levaduras, donde la actividad de una proteína marcadora seleccionable fusionada con dicho scFv se correlaciona con una estabilidad y solubilidad elevadas de dicho scFv en un entorno intracelular. Dicho ensayo de interacción en levaduras, el denominado «control de calidad» se ha descrito con detalle (Auf der Maur *et al.* (2001); Auf der Maur *et al.*, 2004; incorporándose las referencias a la presente en su totalidad).

- es estable durante al menos 1 mes, preferentemente al menos dos meses, de la manera más preferida al menos seis meses de 20 °C a 40 °C, preferentemente a 37 °C en PBS,

55 - sigue siendo monomérico en condiciones fisiológicas,

- es soluble a temperatura ambiente en PBS a concentraciones de > aproximadamente 1 mg/mL, preferentemente de > aproximadamente 4 mg/mL, más preferentemente de > aproximadamente 10 mg/mL, aún más preferentemente de > aproximadamente 25 mg/mL y de la manera más preferente de > aproximadamente 50 mg/mL,

60 - revela un punto medio de transición en una titulación con clorhidrato de guanidinio de al menos 1,5 M, preferentemente de al menos 1,75 M, más preferentemente de al menos 1,9 M, de la manera más preferente de al menos 2 M, es decir, que sea resistente a la desnaturalización.

El término anticuerpo como se utiliza 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 lo tanto, el anticuerpo scFv de la presente invención puede ser un scFv completo que comprende un dominio VL y uno VH que están ligados por un péptido conector corto, por ejemplo, un conector que comprende de 1 a 4 repeticiones de la secuencia GGGGS, preferentemente un péptido (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 16), más preferentemente un conector de la secuencia GGGGSGGGGSGGGGSSGGGS (SEQ ID NO:17) o un conector como se divulga en Alfthan *et al.* (1995) *Protein Eng.* 8:725-731, o simplemente un dominio VL o uno VH, que tiene una capacidad de unión suficiente al antígeno seleccionado. La unión de VL y VH puede ser en cualquier orientación, VL-conector-VH o VH-conector-VL.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo que es estable durante al menos 1 mes, preferentemente al menos dos meses, en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Preferentemente, se estudia la estabilidad de dicho anticuerpo a temperatura fisiológica, es decir, 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 la liofilización a temperatura ambiente. La estabilidad se puede estudiar, por ejemplo, analizando cantidades patrón de dichos anticuerpos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (PAGE) seguido por un procedimiento estándar de tinción, tal como tinción con Coomassie o tinción con plata, y comparando la intensidad de la tinción de la banda completa con la de una proteína patrón. Además, se controla la ausencia de productos de degradación. La proteína degradada corre con cola o es incluso invisible debido a lo pequeños que son los productos de degradación, en cuyo caso únicamente la falta de intensidad de la banda de la proteína completa indica degradación. En general, se puede asumir la estabilidad física de un anticuerpo si no se observan señales de agregación, precipitación y/o desnaturalización tras la inspección visual del color y/o transparencia o según se mide mediante de la dispersión de luz UV o mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

La estabilidad en lo que se refiere a la actividad después de un cierto tiempo de almacenamiento es una característica importante más del anticuerpo de la presente invención. Se puede determinar comparando la potencia del anticuerpo antes y después del almacenamiento, por ejemplo, mediante ensayos de unión a la diana *in vitro* utilizando ELISA o ensayos de actividad celular *in vivo* donde se mide la potencia de inhibición del anticuerpo.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo que es monomérico y lo sigue siendo en condiciones fisiológicas, como se puede juzgar, por ejemplo, por filtración en gel. El estado monomérico es una característica importante de los anticuerpos que son capaces de penetrar en las barreras epiteliales.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un anticuerpo, que es soluble a temperatura ambiente en PBS con concentraciones superiores a aproximadamente 1 mg/mL, preferentemente superiores a aproximadamente 4 mg/mL, de la manera más preferente de aproximadamente 10 mg/mL. La solubilidad del anticuerpo purificado se puede determinar mediante precipitación con PEG utilizando PEG3000, o mediante cromatografía de autointeracción (SIC).

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un anticuerpo que revela un punto medio de transición en una titulación con clorhidrato de guanidinio de al menos aproximadamente 1,5 M, preferentemente de al menos aproximadamente 1,75 M, más preferentemente de al menos aproximadamente 1,9 M, de la manera más preferente de al menos aproximadamente 2 M. Esto es una medida de la estabilidad en el sentido de resistencia frente al desplegamiento, conforme a lo cual el desplegamiento/desnaturalización inducidos por la adición de clorhidrato de guanidinio está seguida por espectroscopía de dicroísmo circular o fluorescente.

En la presente invención, el anticuerpo que tiene una o más de las características biofísicas mencionadas anteriormente está caracterizado estructuralmente por un elemento de armazón del dominio variable de la cadena ligera (VL) con una similitud de al menos un 85%, preferentemente una similitud de al menos aproximadamente un 95%, de la manera más preferente una identidad de al menos aproximadamente un 98% con un elemento de armazón de VL seleccionado del grupo que comprende la SEQ ID NO: 1 (tipo kappa), SEQ ID NO: 2 (tipo kappa), SEQ ID NO: 3 (tipo kappa 3) o SEQ ID NO: 4 (tipo lambda 1), SEQ ID NO: 5 (tipo kappa 3), SEQ ID NO: 6 (tipo lambda 3) o SEQ ID NO: 7 (tipo lambda 3) y/o un elemento de armazón del dominio variable de la cadena pesada (VH) con una similitud de al menos un 85%, preferentemente una similitud de al menos aproximadamente un 95%, de la manera más preferida una identidad de al menos aproximadamente un 98% con un elemento de armazón de VH seleccionado del grupo que comprende la SEQ ID NO: 8 (tipo H3), SEQ ID NO: 9 (tipo H3), SEQ ID NO: 10 (tipo H1b) o SEQ ID NO: 11 (tipo H3). En una realización preferida, se utilizan la combinación entre homólogos de VL de la SEQ ID NO: 2 y homólogos de VH de la SEQ ID NO: 8, la combinación entre homólogos de VL de la SEQ ID NO: 4 y homólogos de VH de la SEQ ID NO: 10, o combinaciones entre homólogos de cualquiera de las secuencias de VL mencionadas anteriormente y un homólogo de VH de la SEQ ID NO: 9. Más preferidos son los anticuerpos con una similitud >90% y aún más preferidos con una similitud >95% con la SEQ ID NO: 7. Los más preferidos son los anticuerpos de secuencia SEQ ID NO: 7 y/o SEQ ID NO: 8. También se entiende que la invención engloba cualquiera de las secuencias de VL divulgadas combinadas con cualquiera de las secuencias de VH divulgadas siempre que se mantenga la especificidad de unión diana.

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

Las similitudes a las que se hace referencia en la presente se van a determinar utilizando los programas BLAST (siglas en inglés de herramientas de búsqueda de alineación local básicas; véase Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990) «Basic local alignment search tool». *J. Mol. Biol.* 215:403-410) a los que se puede acceder en internet. Las búsquedas proteicas BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, calificación = 50, longitud de la palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos similares con las moléculas proteicas de la presente divulgación. Para obtener alineaciones con huecos a efectos comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). El porcentaje 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 una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden llevar a cabo utilizando un algoritmo matemático, como saben bien los expertos en la técnica.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar utilizando el programa GAP en el paquete de software GCG, utilizando la matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70 y 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos también se puede determinar utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de peso de residuos PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48: 444-453 (1970)) que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de software GCG, utilizando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

En otro aspecto, el anticuerpo de la presente invención está modificado químicamente. Las modificaciones químicas pueden cambiar propiedades del anticuerpo tales como la estabilidad, solubilidad, afinidad o especificidad de unión al antígeno, semivida *in vivo* citotoxicidad y capacidad de penetración tisular. El experto en la técnica estará familiarizado con las modificaciones químicas. Una modificación química preferida del anticuerpo de la presente invención es la PEGilación.

En otro aspecto preferido, la afinidad del anticuerpo de la presente invención está caracterizada por una constante de disociación K_d de menos de aproximadamente 100 nM, preferentemente menos de aproximadamente 10 nM y de la manera más preferente menos de aproximadamente 1 nM. Los parámetros de unión tales como la afinidad del anticuerpo por su antígeno relacionado se determinan mediante resonancia de plasmones superficiales (BiaCore) o ELISA. Estos métodos son muy conocidos en la técnica.

Preferentemente, el antígeno al que se une el anticuerpo de la presente invención es TNF α (factor de necrosis tumoral alfa). TNF α , también conocido como caquectina, es una citocina de mamífero de origen natural producida por numerosos tipos celulares, incluidos monocitos y macrófagos en respuesta a endotoxinas u otros estímulos. TNF α es un mediador importante de las reacciones inflamatoria, inmunológica y patofisiológica (Grell, M., *et al.* (1995) *Cell*, 83: 793-802). Un gran número de trastornos están asociados con niveles elevados de TNF α , muchos de los cuales con una importancia médica significativa. Se ha mostrado que TNF α presenta un aumento regulado en varias enfermedades humanas, incluidas las enfermedades crónicas tales como artritis reumatoide (RA, por sus siglas en inglés), trastornos intestinales inflamatorios que incluyen la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, septicemia, insuficiencia cardíaca congestiva, asma bronquial y esclerosis múltiple. TNF α también se denomina citocina proinflamatoria. Sin embargo, también está implicado en trastornos con una manifestación local, tales como enfermedades oculares, por ejemplo, degeneración macular, uveítis, glaucoma, cataratas, retinitis, síndrome del ojo seco, escleritis, conjuntivitis y queratitis. El anticuerpo de la presente invención es especialmente adecuado para el tratamiento de tales enfermedades, ya que se puede aplicar de manera local y tópica, por ejemplo, para enfermedades oculares mediante gotas oculares.

La presente invención también proporciona una secuencia de ADN que codifica el anticuerpo monocatenario (scFv) de la presente invención, así como también un vector de clonación o expresión que contiene dicha secuencia de ADN. Además, se proporciona una célula hospedadora adecuada transformada con dicha secuencia de ADN. Esta puede ser una célula procariota o eucariota, en particular, una célula de *E. coli*, levadura, planta, insecto o mamífero.

El anticuerpo de la presente invención se puede generar utilizando técnicas rutinarias en el campo de la genética recombinante. Si se conocen las secuencias de los polipéptidos, se pueden generar los ADNc que las codifican mediante síntesis génica.

5 Además, en la presente se divulga un método para la producción del anticuerpo de la presente invención, que comprende cultivar la célula hospedadora transformada con el ADN que codifica dicho anticuerpo en condiciones que permitan la síntesis de dicho anticuerpo y recuperar dicha molécula de dicho cultivo. Preferentemente, dicho método proporciona un anticuerpo scFv purificado a partir de cuerpos de inclusión de *E. coli* o a partir del periplasma de *E. coli*, si el constructo de scFv utilizado comprende una secuencia señal que dirige el polipéptido al periplasma.

10 Otro aspecto de la presente invención es el uso del anticuerpo monocatenario (scFv) proporcionado por la presente invención como una herramienta para el diagnóstico, preferentemente diagnóstico *in vitro*, y/o como un agente farmacéutico. Este uso es especialmente preferido en el contexto de cualquier afección relacionada con TNF α . La enfermedad que se va a tratar con cualquier scFv anti-TNF α o fragmento de este es preferentemente una enfermedad relacionada con la sobreexpresión de TNF α . Si la sobreexpresión de TNF α da lugar a una función celular anómala, un anticuerpo que se puede unir y, por lo tanto, neutralizar el TNF α en exceso es un agente farmacéutico ideal para el tratamiento de tal enfermedad, si dicho anticuerpo puede alcanzar el lugar del exceso de TNF α . Si este lugar está dentro de la célula, el anticuerpo debe ser capaz de entrar en la célula. Si este lugar es extracelular, el anticuerpo debe ser capaz de alcanzar la matriz extracelular en un tejido, es decir, debe cruzar al menos la capa celular más exterior de un tejido, que es normalmente la capa celular epitelial. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo es capaz de penetrar en el endotelio.

IV. Composiciones farmacéuticas y administración farmacéutica

25 A. Composiciones y administración

En la mayoría de los casos, el anticuerpo de la presente invención se utilizará en una composición farmacéutica, comprendiendo dicha composición farmacéutica al menos un compuesto adicional. Preferentemente, este estará combinado con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. El excipiente se puede seleccionar del grupo que comprende azona, 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, dextransulfato, EDTA, edetato de disodio, etanol, fusidato, glicocolato, laurilsulfato, L- α -lisofosfatidilcolina, N-laurilsarcosina, NMP, ácido oleico, fosfolípidos, éter laurílico de polioxietileno-9, saponina, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, taurocolato, taurodesoxicolato, péptidos y derivados peptídicos que abren las uniones herméticas, proteínas y derivados proteicos que abren las uniones herméticas. Preferentemente, el excipiente se selecciona del grupo que comprende cloruro de benzalconio, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 y clorhexidina. También es posible utilizar caprato. Tales sustancias pueden funcionar como potenciadores de la penetración.

40 En la mayoría de los casos la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la presente invención se aplicará de manera local más que sistémica. El anticuerpo de la presente invención es particularmente adecuado para la aplicación local, ya que su formato scFv es pequeño, y su elemento de armazón tiene características fisicoquímicas que permiten que penetre en las barreras tisulares epiteliales. Una aplicación local es una aplicación en un área relativamente restringida tal como es el ojo, la cavidad nasal, la cavidad oral, el tubo intestinal, la piel, la mucosa de la boca y el aparato genitourinario, las articulaciones y espacios articulares, el cerebro, las vértebras, etc., donde es eficaz la aplicación de un volumen relativamente pequeño de anticuerpo lo suficientemente concentrado. Por otra parte, la aplicación tópica es una aplicación a la superficie de una parte del cuerpo.

50 La forma preferida de administración de la composición farmacéutica de la presente invención es mediante aplicación tópica; sin embargo, otras formas son por inhalación, por ejemplo, si el anticuerpo está destinado a penetrar en el epitelio pulmonar. El suministro pulmonar se puede lograr utilizando un inhalador o nebulizador y una formulación que comprende un agente aerosolizante.

55 Para las aplicaciones tópicas, el lugar preferido es el ojo. El anticuerpo de la presente invención es especialmente adecuado para penetrar en la córnea, que está constituida principalmente por tres capas tisulares, concretamente el epitelio, el estroma y el endotelio. Por lo tanto, el anticuerpo se puede utilizar para el tratamiento de muchas enfermedades del ojo.

60 B. Sistemas de suministro de fármacos

Los ejemplos no limitantes de los sistemas de suministro de fármacos oculares tópicos para su uso en la invención incluyen potenciadores de la penetración, escudos de colágeno para la córnea, iontoforesis ocular, micropartículas o nanopartículas, insertos oculares, polímeros mucoadhesivos, sistema gelificante *in situ*, dendrímeros, emulsiones de lípidos e insertos oculares (véase Sultana, *et al.* (2007) *Future Drugs*, 2(2), 309-323 (2007). i.

65

i. *Potenciadores de la penetración*

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir un potenciador de la penetración. Los ejemplos de potenciadores de la penetración son muy conocidos en la técnica 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, dextransulfato, EDTA, edetato de disodio, etanol, fusidato, glicocolato, laurilsulfato, L- α -lisofosfatidilcolina, metazolamida, N-laurilsarcosina, NMP, ácido oleico, Pz-péptido, fosfolípidos, éter laurílico 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 otra realización más, el potenciador de la penetración incluye sistemas coloidales, poliacrilatos y polímero bioadhesivo.

ii. *Escudos de colágeno para la córnea*

Los anticuerpos de la invención también se pueden administrar con un escudo de colágeno para la córnea. En algunas realizaciones, se pueden utilizar escudos de colágeno con tiempos de disolución de 12, 24 y 72 horas. En otras realizaciones, el escudo de colágeno se empapa previamente en soluciones de gatifloxacina y/o moxifloxacina.

iii. *Iontoforesis ocular*

Los anticuerpos de la invención también se pueden suministrar mediante iontoforesis ocular. En una realización, los anticuerpos se pueden suministrar al segmento anterior del ojo mediante iontoforesis transcorneal. En otra realización, se pueden suministrar concentraciones elevadas y sostenidas de los anticuerpos de la invención al vítreo y la retina mediante iontoforesis transesclerótica. La iontoforesis se aplica durante el periodo de tiempo deseado. 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*

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

También se pueden utilizar nanopartículas, partículas menores de 1 μm . En una realización, la nanopartícula es una nanocápsula. En otra realización, la nanopartícula es una nanoesfera. En otra realización, la nanopartícula comprende policianoacrilato de acrílo (PACA, por sus siglas en inglés). En otra realización, la nanopartícula comprende poli- α -caprolactona. En ciertas realizaciones, la nanopartícula comprende nanopartículas lipídicas sólidas que contienen un 2,5% de tobramicina con hexadecilfosfato. En otras realizaciones, la nanopartícula comprende Eudragit RS 100 o Eudragit RL 100 y opcionalmente comprende además cloricromeno. En otras realizaciones, la nanopartícula comprende nanosuspensiones de polímero de acrilato cargado con flurbiprofeno (FB).

v. *Insertos oculares*

Los anticuerpos de la invención también se pueden administrar utilizando insertos oculares. En algunas realizaciones, los insertos oculares son insertos insolubles, solubles o bioerosionables. Los insertos insolubles incluyen sistemas difusionales, sistemas osmóticos y lentes de contacto hidrófilas. Los insertos solubles pueden estar compuestos de polímeros naturales, sintéticos o semisintéticos. Los insertos bioerosionables pueden estar compuestos por polímeros bioerosionables.

vi. *Polímeros mucoadhesivos*

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir polímeros mucoadhesivos. Los ejemplos de polímeros mucoadhesivos son muy conocidos en la técnica e incluyen quitosano (CS), Ch-HCL y N-carboximetilquitosano (CMCh), polímeros de N-trimetilquitosano (TMC), CS cargado con pilocarpina/Carbopol®, ácido poliacrílico (PAA, por sus siglas en inglés), polisacáridos, xiloglucano, polisacárido de semillas de tamarindo (TSP, por sus siglas en inglés) y polímeros tiolados o tiómeros.

vii. *Sistemas de gelificación in situ*

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir sistemas de gelificación *in situ*. Los ejemplos de sistemas de gelificación *in situ* son muy conocidos en la técnica e incluyen sistemas de gelificación *in situ* mediados por el pH, sistemas de gelificación *in situ* mediados por la temperatura y sistemas de gelificación *in situ* mediados por

iones. Los sistemas de gelificación *in situ* mediados por el pH incluyen, por ejemplo, polímeros tales como acetato-ftalato de celulosa (CAP, por sus siglas en inglés) y Carbopol®. Los sistemas de gelificación *in situ* mediados por la temperatura pueden incluir, por ejemplo, pluronics, tetraonics y etilhidroxietilcelulosa. Los sistemas de gelificación *in situ* también pueden incluir Gelrite® (goma gellan desacetilada (DCG, por sus siglas en inglés)), alginatos, por ejemplo, alginato-poli(L-Lisina), soluciones oftálmicas de maleato de timolol, por ejemplo, Timoptol XE y Lizmon TG®, y combinaciones de estos.

viii. *Dendrímeros*

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir dendrímeros. Los ejemplos de dendrímeros son muy conocidos en la técnica e incluyen TM poliamidoamina (PAMAM).

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., como saben los expertos en la técnica. Cualquiera de los sistemas de suministro mencionados anteriormente se puede administrar por vía tópica, intraocular, subconjuntiva o mediante implante para dar como resultado la liberación sostenida del agente durante un periodo de tiempo. La formulación puede estar en forma de un vehículo, tal como una micro- o macrocápsula o matriz de polímeros biocompatibles tales como policaprolactona, ácido poliglicólico, ácido poliláctico, polianhídridos, polilactida-co-glicólidos, poliaminoácidos, polióxido de etileno, polióxido de etileno terminado con acrílico, poliamidas, polietilenos, poliacrilonitrilos, polifosfazenos, poli(*orto*-ésteres), acetato-isobutirato de sacarosa (SAIB, por sus siglas en inglés) y otros polímeros tales como los divulgados en las patentes de EE. UU. 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 se pueden formular como microesferas o liposomas. Se puede administrar una formulación microscópica o macroscópica por vía tópica o a través de una jeringa, o se puede implantar. Se pueden proporcionar propiedades de liberación retardada o prolongada mediante varias formulaciones del vehículo (microesfera recubierta o no recubierta, cápsula recubierta o no recubierta, componentes lipídicos o poliméricos, estructura unilamelar o multilamelar y combinaciones de los anteriores, etc.). La formulación y carga de microesferas, microcápsulas, liposomas, etc., y su implantación ocular y técnicas estándar conocidas por el experto en la técnica, por ejemplo, el uso de un implante de liberación sostenida de ganciclovir para tratar la retinitis por citomegalovirus, se divulgan 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, un implante intraocular de liberación sostenida se puede insertar a través de la parte plana para su implantación en la cavidad vítrea. Una inyección intraocular se puede producir en el vítreo (intravítreo) o bajo la conjuntiva (subconjuntiva) o detrás del ojo (retrobulbar) o bajo la cápsula de Tenon (subtenónica) y puede adoptar una forma de liberación diferida. La composición se puede administrar mediante una lente de contacto aplicada en la superficie exterior de un ojo, donde la composición se incorpora al material de la lente (por ejemplo, en la fabricación o está contenida en una solución para la lente). La composición se puede administrar mediante una lente intraocular (IOL, por sus siglas en inglés) que se implanta en el ojo. Las lentes implantables incluyen cualquier IOL utilizada para reemplazar un cristalino enfermo del paciente tras la operación de cataratas, que incluyen, sin carácter limitante, las fabricadas por Bausch y 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 del cristalino, la composición proporciona el efecto deseado al ojo. Las concentraciones adecuadas para los implantes (lentes y otros tipos) y para la administración mediante lentes de contacto pueden variar, como apreciará el experto en la técnica. Por ejemplo, se puede cargar un implante con una cantidad elevada de agente, pero formularse o regularse de manera que libere de manera sostenida una concentración requerida dentro de los intervalos descritos anteriormente (por ejemplo, formulación de liberación lenta).

Se ha observado que las concentraciones de anticuerpo que se logran normalmente con scFv en el intervalo de hasta 1 mg/mL no son muy eficaces para la penetración epitelial a menos que se añadan potenciadores de la penetración adicionales (WO 0040262). La presente invención se refiere a anticuerpos que son sumamente solubles, de modo que se pueden preparar composiciones farmacéuticas que comprenden dicho anticuerpo con concentraciones más elevadas, es decir, superiores a aproximadamente 2 mg/mL, preferentemente superiores a aproximadamente 5 mg/mL, de la manera más preferente superiores a aproximadamente 10 mg/mL y utilizar en un tratamiento eficaz de la correspondiente enfermedad relacionada con el antígeno.

Así pues, en la presente se divulga el tratamiento de una enfermedad relacionada con antígenos, donde el suministro del anticuerpo al sitio de la interacción antígeno-anticuerpo requiere la penetración en un tejido que comprende uniones herméticas, en particular, un epitelio y/o un endotelio. Un epitelio es un tejido compuesto por una capa de células, y recubre tanto el exterior (piel) como el interior (por ejemplo, intestino) de los organismos. Los epitelios también incluyen las membranas mucosas que recubren el interior de la boca y cavidades del cuerpo y comprenden células epiteliales escamosas muertas, y células epiteliales que recubren el interior de los pulmones, el tubo gastrointestinal y el aparato reproductivo y urinario. Un endotelio es una capa de células planas, finas que recubre la superficie interior de los vasos sanguíneos y órganos. En la vasculatura forma una interfaz entre la sangre circulante

y la luz y el resto de la pared del vaso. Las células endoteliales recubren todo el sistema circulatorio, desde el corazón hasta los capilares más pequeños. En vasos sanguíneos pequeños y capilares, las células endoteliales son a menudo el único tipo celular presente. Las células endoteliales también controlan el paso de materiales dentro y fuera del torrente sanguíneo. En algunos órganos, hay células endoteliales sumamente diferenciadas para realizar funciones de «filtro» 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 puede conseguir penetrar en la córnea. El epitelio corneal cubre el frente de la córnea y está constituido por varias capas de células, que hacen que la penetración de un anticuerpo sea aún más difícil. El anticuerpo de la presente invención es preferentemente capaz de penetrar en toda la córnea.

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

Un inhibidor de TNF α aplicado localmente que comprende propiedades farmacocinéticas adecuadas puede ofrecer soluciones a todos estos aspectos. La buena penetración del anticuerpo scFv anti-TNF α ESBA105 dentro de la parte anterior del ojo combinada con su elevada actividad neutralizante de TNF α puede llevar en última instancia a concentraciones intraoculares que son muy adecuadas para la eficacia terapéutica en uveítis anterior. Teniendo en cuenta que los niveles de TNF α detectados en el ojo enfermo fueron de 15 pg/mL y que las concentraciones de ESBA105 medidas fueron de hasta 40 000 ng/mL en la parte anterior (véase la Figura 7) y de hasta 125 ng/mL para la parte vítrea del ojo (véase la Figura 8), los autores concluyeron que ESBA105 no solo es adecuado para el tratamiento de la 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 lo tanto, a un anticuerpo para el tratamiento de trastornos oculares mediante la aplicación tópica al ojo, en particular, para el tratamiento de cualquier forma de uveítis, enfermedad de Behçet, retinitis, síndrome del ojo seco, glaucoma, síndrome de Sjögren, diabetes mellitus (incluida la neuropatía diabética), escleritis, conjuntivitis y queratitis. La administración ocurre preferentemente mediante gotas oculares, pomada ocular o desde depósitos de liberación diferida como las lentes de contacto.

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

En el caso de tratamiento en el pulmón, se debe utilizar la inhalación para aplicar el anticuerpo de la presente invención al epitelio pulmonar.

En otro aspecto más, se utiliza el anticuerpo como una herramienta diagnóstica.

Las secuencias de la presente invención son las siguientes:

SEQ ID NO: 1 VL del tipo kappa 1

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQ
PDDFATYYCQQYKSYWTFGGTKLTVLG

SEQ ID NO: 2 VL del tipo kappa 1

EIVLTQSPSSLSASVGDRTLTTCRASQGIRNELAWYQQRPGKAPKRLIYAGSILQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQ
PEDVAVYYCQQYSLPYMFGGQTKVDIKR

SEQ ID NO: 3 VL del tipo kappa 3

EIVMTQSPATLSVSPGESAAALSCRASQGVSTNVAWYQQKPGQAPRLLIYGATTRASGVPARFSGSGSGTEFTLTINSL
QSEDFAAAYCQQYKHWPPWTFGGGQTKVEIKR

SEQ ID NO: 4 VL del tipo kappa 3

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTLTHYLAWYQQKPGQAPRLLIYDTSKRATGTPARFSGSGSGTDFTLTISLQ
PEDSALYYCQQRNSWPHTFGGGTKLEIKR

SEQ ID NO: 5 VL del tipo lambda 1

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSTSNIGDNYVSWYQQLPGTAPQLLIYDNTKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITG
LQTGDEADYYCGTWDSLSGVVFGGGTKLTVLG

ES 2 820 837 T3

SEQ ID NO: 6 VL del tipo lambda 3

5 SYVLTQPPSVSVAPGQTATVTCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIRRV
EAGDEADYYCQVWDSSSDHNVFGSGTKVEIKR

SEQ ID NO: 7 VL del tipo lambda 3

10 LPVLTQPPSVSVAPGQTARISCGGNNIETISVHWYQQKPGQAPVLVSDSVRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVE
AGDEADYYCQVWDSSSDYVVFVGGGKLTVLG

SEQ ID NO: 8 VH del tipo H1b

15 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGYSFTGYFLHWVRQAPGQGLEWMGRINPDSGDTIYAQKFQDRVTLTRDTSI
GTVYMELTSLTSDDTAVYYCARVPRGTYLDPWDYFDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 9 VH del tipo H3

20 QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAHVLRFLWLPDAFDIWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 10 VH del tipo H3

25 EVQLVESGGGVAQPGGSLRVSCAASGFSFSSYAMQWVRQAPGKGLEWVAVISNDGRIEHYADAVRGRFTISRDN
SNTVFLQMNSLRSDDTALYYCAREIGATGYLDNWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 11 VH del tipo H3

30 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDAGIAVAGTCFDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 12 TB-A

35 DIVMTQSPSSLSASVGDRVTLTCTASQSVSNDVWVYQQRPGKAPKLLIYSAFNRYTGVPFRFSGRGRYGTDFTLTISS
LPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTKLEVKRGGGGSGGGGSGGGGSSGGGSSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCT
ASGYTFTHYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTYTGPEPTYADKFKDRFTFSLETSASTVYMELTSLTSDDTAVYYCARE
RGDAMDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 13 ESBA105

40 DIVMTQSPSSLSASVGDRVTLTCTASQSVSNDVWVYQQRPGKAPKLLIYSAFNRYTGVPFRFSGRGRYGTDFTLTISS
LPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTKLEVKRGGGGSGGGGSGGGGSSGGGSSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCT
ASGYTFTHYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTYTGPEPTYADKFKDRFTFSLETSASTVYMELTSLTSDDTAVYYCARE
RGDAMDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 14 TB-WT

50 DIVMTQTPKFLVLSAGDRVTITCTASQSVSNDVWVYQKPGQSPKMLMYSANRYTGVPDRFTGRGYGTDFFTISS
VQAEDLAVYFCQQDYNSPRTFGGGTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSSGGGSSQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKA
SGYTFTHYGMNWVRQAPGKGLKWMGWINTYTGPEPTYADDFKEHFASLETSASTVFLQINNKNEDTATYFCARER
GDAMDYWGQGSTVTVSS

SEQ ID NO: 15 scFv Lucentis

55 DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
LPEDFATYYCQYSTVPWTFGQGTKVEIKRGGGGSGGGGSGGGGSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
GYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVWGWINTYTGPEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPY
YTTSSHWFYFDVWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 16 conector

GGGGSGGGGSGGGGSGGGG

SEQ ID NO: 17 conector

GGGGSGGGGSGGGGSSGGGS

5 SEQ ID NO: 18 ESBA105-QC15.2

DIVMTQSPSSLSASVGDRVLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPKLLIYSAFNRYTGVPFRFSGRGGYGTDFLTISL
 QPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTKLEVKRGGGGSGGGGSSGGGSSGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVST
 10 ASGYTFTHYGMNWVRQAPGRGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRITFSLETSASTVYMELTSLTSDDTAVYYCARE
 RGDAMDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 19 ESBA105-H_F68A

DIVMTQSPSSLSASVGDRVLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPKLLIYSAFNRYTGVPFRFSGRGGYGTDFLTISL
 15 QPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTKLEVKRGGGGSGGGGSSGGGSSGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVST
 ASGYTFTHYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRATFSLETSASTVYMELTSLTSDDTAVYYCARE
 RGDAMDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 20 TB-H_F68V_F70L

DIVMTQSPSSLSASVGDRVLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPKLLIYSAFNRYTGVPFRFSGRGGYGTDFLTISL
 20 QPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTKLEVKRGGGGSGGGGSSGGGSSGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVST
 ASGYTFTHYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRVTLTSLTSDDTAVYYCARE
 RGDAMDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 21 TB-H_F70L

DIVMTQSPSSLSASVGDRVLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPKLLIYSAFNRYTGVPFRFSGRGGYGTDFLTISL
 25 QPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTKLEVKRGGGGSGGGGSSGGGSSGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVST
 ASGYTFTHYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRFTLSLETSASTVYMELTSLTSDDTAVYYCARE
 RGDAMDYWGQGLTVTVSS

Ejemplificación

35 A lo largo de los ejemplos, se utilizan los siguientes materiales y métodos a menos que se indique lo contrario.

Materiales y métodos

En general, la puesta en práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas
 40 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)*, McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow et al., C.S.H.L. Press, Pub. (1999);
 45 *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons (1992).

Ejemplo 1: Producción de scFv

Se produjeron los anticuerpos scFv mediante expresión como cuerpos de inclusión, seguida por un paso de
 50 replegamiento y de cromatografía. Se produjeron tres anticuerpos monocatenarios. Esto incluye dos scFv
 convencionales, que presuntamente no satisfacen los criterios de ser muy solubles, particularmente estables y
 monoméricos. Uno de ellos es TB-wt (SEQ ID NO: 14), que se construyó ligando las secuencias de VL y VH naturales
 del anticuerpo monoclonal anti-TNF α murino Di62 (Doring et al., 1994). El otro es lucentis-scFv, que se construyó
 55 ligando las secuencias de 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 . La solubilidad,
 estabilidad y comportamiento monomérico de ESBA105 se optimizaron empleando un elemento de armazón 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 divulga en la SEQ ID NO: 13.

60 La Figura 1 muestra los perfiles de elución de ESBA105 (A), TB-wt (B) y lucentis-scFv (C) de la filtración en gel
 preparativa, que sigue al paso de replegamiento. Mientras que el perfil para ESBA105 consiste principalmente en un
 pico estrecho de hasta 300 mUA (unidades relativas de absorción), se pueden observar varios picos amplios con
 alturas máximas de 16 y 55 mUA, respectivamente, en los perfiles de TB-wt y lucentis-scFv. Esto indica que la calidad
 65 de los cuerpos de inclusión y o el proceso de replegamiento es mucho menos eficaz para TB-wt y lucentis-scFv en
 comparación con ESBA105.

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

Construcción del plásmido pGMP002 para la expresión de ESBA105:

La secuencia que codifica ESBA105 se ligó en los sitios NcoI - HindIII de pET-24d(+) (Novagen, número de catálogo 69752-3). Posteriormente, se eliminó el fragmento Bpu11021 - NotI del constructo resultante mediante ligadura de extremos romos después de que los extremos adherentes producidos por las digestiones con Bpu11021 y NotI fueran rellenados mediante la reacción de la polimerasa T4 para producir pGMP003. pGMP002 se produjo eliminando Bpu11021 - NotI de pET-24d(+) directamente.

Expresión de ESBA105 en *E. coli*:

Para la expresión de ESBA105, se transformó BL21 (DE3) de *E. coli* (Novagen) con el plásmido de expresión pGMP002. Se prepararon cultivos madre en glicerol a partir de colonias únicas, se cultivaron en medio M9 (Sambrook *et. al*, *Molecular Cloning, A laboratory Manual*) que contenía un 1% de glucosa, 1 mL/L de una solución de oligoelementos (Wang y Lee, *Biotechnol Bioeng* 58:325-328) y 50 µg/mL de kanamicina. Las células se cultivaron durante toda la noche a 37 °C, se añadió glicerol hasta un 20% y se almacenaron alícuotas de 1 mL como soluciones madre 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 contenía un 1% de glucosa, 1 mL/L de una solución de oligoelementos y 50 µg/mL de kanamicina, con 1 mL de una solución madre en glicerol. Se cultivó el precultivo durante toda la noche a 37 °C y 200 rpm en un matraz de agitación con deflectores. Un segundo precultivo con 250 mL del mismo medio se inoculó con el primer precultivo y se cultivó durante tres horas más a 37 °C.

Los cultivos del biorreactor se realizaron en un biorreactor de 5 L (BioFlo 110, New Brunswick Scientific), que contenía un volumen inicial de 3 L del mismo medio sintético utilizado para los precultivos. La temperatura de cultivo se fijó a 37 °C. El pH del cultivo se controló a 7,0 mediante la adición de amoníaco al 25% en agua y ácido fosfórico 1 M. El nivel de oxígeno disuelto se mantuvo por encima de un 20% del nivel de saturación del aire variando el porcentaje de oxígeno puro con una tasa de aireación global de 4 L/min. En el biorreactor se inoculó el segundo precultivo y se hizo funcionar en modo discontinuo hasta una DO₆₀₀ de 10-12. A continuación, se inició la alimentación de glucosa exponencial con una tasa de 0,15 h⁻¹ con una solución de glucosa al 50% que contenía 10 g/L de MgSO₄·7H₂O y 5 mL/L de solución de oligoelementos. Después de 16 h, se indujo la expresión proteica mediante la adición de IPTG hasta 1 mM y se siguió con la alimentación exponencial durante 3 h. A continuación, se recolectaron las células por centrifugación a 4600 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 disgregación celular, se hizo pasar dos veces la suspensión a través de un homogeneizador de presión elevada (Niro Soavi, Panda 2K) a 1000 bar. Las células disgregadas se centrifugaron durante 1 h a 4600 rpm y los cuerpos de inclusión resultantes se resuspendieron en 2 L de tampón TBS, que contenía un 0,5% de LDAO (*N*-óxido de *N,N*-dimetildodecilamina, Fluka). Los cuerpos de inclusión se lavaron repetidamente hasta que no se detectó proteína residual significativa en el sobrenadante de lavado. Finalmente, los cuerpos de inclusión se lavaron dos veces con tampón de TBS sin LDAO.

Replegamiento de ESBA105:

Los cuerpos de inclusión se solubilizaron en un volumen 10 veces superior de tampón de solubilización que contenía guanidinio-HCl 6 M, Tris 100 mM, EDTA 1 mM y DTT 20 mM a pH 8,0, y se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente. La proteína solubilizada se replegó a continuación mediante dilución 1:50 en tampón de replegamiento que contenía urea 3 M, Tris 100 mM y cisteína y cistina, cada una 2 mM, a pH 8,5. El replegamiento se prolongó durante 24 h a temperatura ambiente. Después del replegamiento, se retiraron los precipitados mediante filtración profunda y la solución de replegamiento se concentró hasta un 50% del volumen inicial. La solución de replegamiento concentrada se dializó a continuación contra un volumen 4 veces mayor de tampón PBS (Na-fosfato 50 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5) y se concentró aún más hasta una concentración proteica de aproximadamente 1 mg/mL.

Purificación de ESBA105 por cromatografía:

Se purificó ESBA105 en dos pasos cromatográficos: cromatografía de filtración en gel y de intercambio catiónico. Todos los pasos cromatográficos se llevaron a cabo con sistemas de purificación ÄKTA (GE Healthcare).

Para la cromatografía por filtración en gel preparativa, se utilizó una columna Sephadex S75 26/60 (GE Healthcare) con tampón PBS (Na-fosfato 50 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5) como tampón de cromatografía (*running buffer*). La fracción de ESBA105 recogida se eluyó con un volumen de retención de aproximadamente 185 mL como un único pico.

Se utilizó Fractogel EMD SO_3^- (M) (Merck) como resina de la columna para el segundo paso cromatográfico. La resina se equilibró con cinco volúmenes de columna de tampón de equilibración (Na-acetato 50 mM, pH 5,5). Las fracciones del pico de ESBA105 de la filtración en gel se diluyeron 10 veces con Na-acetato 50 mM pH 5,5 y a continuación, se cargaron en la columna con una tasa de flujo de 5 mL/min. Después de la carga, la columna se lavó con cinco volúmenes de columna de tampón de equilibración. Se utilizó un gradiente lineal de 0 - 35% de tampón de elución (Na-acetato 50 mM, NaCl 500 mM, pH 5,5) de 60 minutos o menos y 5 mL/min para la elución de ESBA105. El pico más prominente después de la elución se recogió e identificó como ESBA105. La fracción de ESBA105 recogida se dializó finalmente contra PBS (Na-fosfato 50 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5) y se almacenó a -80 °C.

15 **Ejemplo 2: Caracterización biofísica de los scFv**

Con el fin de estudiar su «adecuación como fármaco» (*drug-likeness*), se realizó la caracterización biofísica de ESBA105 y algunos de sus derivados. La caracterización conllevó la determinación de (1) parámetros de solubilidad (precipitación con PEG y valor B_{22} ; el valor B_{22} es una medida de la autointeracción proteica, que es importante en el crecimiento cristalino, solubilización y agregación proteicos. Véase Valente *et al.*, *Biophys J.* diciembre de 2005;89(6):4211-8, publicación electrónica del 30 de septiembre de 2005), (2) los valores de pI, (3) la medida de la desnaturalización térmica y caotrópica y (4) la cuantificación de la fracción monomérica en comparación con la fracción oligomérica. Los resultados de los puntos 1-3 se resumen en la Tabla 1, que también incluye los valores de potencia relativa según se determinaron mediante los ensayos con L929 y KYM-1, respectivamente.

25 **Tabla 1. Resumen de los datos de algunos derivados de ESBA105**

SEQ	pI	$S_{\text{máx}}$ (prec. PEG)	Valor B_{22} (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	Inicio de la desnaturalización [°C]	[GdnHCl] en el punto medio del despliegamiento	Potencia relativa: $CE_{50X} / CE_{50ESBA105}$	
			Células L929	Células KYM-1
ESBA105	53	2,07 M	1,0	1,0
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

30 **Ejemplo 3: Estabilidad de scFv durante el almacenamiento**

La estabilidad del scFv en el tiempo es una característica importante en el contexto de un agente farmacéutico. La Fig. 4 muestra el análisis del scFv ESBA105 (carriles 1-6) y del scFv QC15.2 (carriles 7-12) que se separaron mediante SDS-PAGE y se tiñeron con Coomassie después de dos semanas de almacenamiento a diferentes temperaturas (-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 siguieron siendo estables en todos los intervalos de temperatura y en todas las concentraciones estudiadas, y no se observaron señales de degradación o agregación.

Un anticuerpo que es estable durante un cierto tiempo también debería mantener toda su actividad. Por lo tanto, los autores estudiaron ESBA105 ocho semanas después del almacenamiento a 37 °C u 80 °C en ensayos con L929 para determinar su actividad. El resultado se presenta en la Fig. 5 y no se pudo apreciar diferencia entre las dos temperaturas.

5

Ejemplo 4: Penetración ex vivo de ESBA150 en ojos de conejo completos

Se estudió la cantidad de ESBA105 que penetró en los diferentes compartimentos de ojos de conejo completos en diversas condiciones en un contexto *ex vivo*. Para estas series de experimentos, se colocaron los ojos del conejo en placas de ensayo de incubación que tenían depresiones en su superficie. La depresión contenía la solución de prueba con ESBA105 y los ojos de los conejos se colocaron en las placas de prueba de modo que la córnea estuviera en contacto con la solución 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 de ESBA105. Para este análisis, se utilizó una jeringa para retirar sondas de los compartimentos de interés (véase la Fig. 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 estudió ESBA105 con concentraciones de 1, 2, 5 y 10 mg/mL. La concentración de 1 mg/mL se estudió posteriormente en presencia de un 0,5% de ácido cáprico. Previamente Thiel *et al.* (*Clin. Exp. Immunol.* abril de 2002;128 (1):67-74) habían mostrado que un 0,5% de ácido cáprico potenciaba la penetración a través de la córnea. Cuando se administró 1 mg/mL en presencia de un 0,5% de ácido cáprico, los autores midieron una concentración de ESBA105 en la parte anterior del ojo de aproximadamente 40 µg/mL, que fue aproximadamente la misma en comparación con las concentraciones medidas después de la administración de 10 mg/mL en ausencia de ácido cáprico (Fig. 7). Notablemente, cuando los resultados de estos dos modos de administración se compararon en el líquido 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 (Fig. 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 (Fig. 8).

Las placas de ensayo de incubación de ojos se preincubaron con tampón de bloqueo (5% de leche en polvo con poca grasa en PBS, pH 7,4) durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente las placas se lavaron con PBS y posteriormente se secaron incubándolas a 37 °C durante 30 minutos. Cada uno de los pocillos de las placas secas se llenó con 125 µL de solución de prueba y se colocaron ojos de conejo aislados en los pocillos de manera que solo la córnea estuviera en contacto con la solución de prueba. Después de la incubación a 37 °C y un 100% de humedad durante 4 horas, los ojos se lavaron durante 3 horas con PBS. Se llevó a cabo una paracentesis utilizando una aguja 25G para la cámara del ojo anterior y una aguja de 22G para el cuerpo vítreo.

La concentración de ESBA105 en las sondas se realizó mediante ELISA de la siguiente manera: Las sondas se centrifugaron con una microcentrífuga de sobremesa a 13 000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Las sondas del compartimento anterior se diluyeron 1:10, 1:100 y 1:1000, las sondas del compartimento vítreo se diluyeron 1:5 en TBST (TBS complementado con un 0,005% de Tween) que contenía un 0,5% de leche en polvo con poca grasa (se denomina en lo sucesivo en la presente solución de dilución) para la prueba de ELISA.

Se recubrieron placas de 96 pocillos ELISA (Nunc Maxisorb; número de catálogo 442404) con 0,5 µg/mL de TNF α humano durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se lavaron las placas 3 veces con TBST a temperatura ambiente y se incubaron con 300 µL de tampón de bloqueo (5% de leche en polvo con poca grasa en TBST) por pocillo durante 60 min a temperatura ambiente en un agitador (500-600 rpm). Después del paso de bloqueo, las placas se lavaron 3 veces con TBST antes de añadir 50 µL de las sondas diluidas a cada pocillo y las placas se incubaron en un agitador (500 - 600 rpm) durante 90 minutos a temperatura ambiente. Después de este paso de incubación, las placas se lavaron 3 veces con TBST, antes de añadir 50 µL de una solución 1:10 000 (diluida en solución de dilución) del anticuerpo secundario AKA3A biotinilado a cada pocillo. AKA3A biotinilado es un anticuerpo policlonal de conejo anti-ESBA105, que estaba recién biotinilado (de acuerdo con protocolos estándar de biotinilación). Después de 90 minutos de incubación en un agitador (500-600 rpm) a temperatura ambiente, las placas se lavaron 3 veces con TBST, antes de añadir 50 µL de una dilución 1:2000 (diluida en solución de dilución) de peroxidasa de rábano picante acoplada con estreptavidina (poliHRP40-estreptavidina, 1 mg/mL; STD; n.º SP40C). Después de 60 minutos de incubación en un agitador (500-600 rpm) a temperatura ambiente, las placas se lavaron 3 veces con TBST y 2 veces con ddH $_2$ O. Se detectó la actividad de la peroxidasa de rábano picante (HRP) tras la adición de 50 µL de sustrato POD azul BM (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 HRP mediante la adición de 50 µL de HCl 1 M a cada pocillo. La reacción de HRP se cuantificó mediante medidas espectrométricas a 450 nm en un lector TECAN Genios.

Finalmente, se determinó la concentración de ESBA105 de la sonda por comparación con una curva estándar, que se produjo en paralelo.

Ejemplo 5: Penetración a través de monocapas de células Caco-2 por ESBA105

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

Ejemplo 6: Penetración a través de yeyuno de ratón

Se escindieron aproximadamente 5 cm de yeyuno de ratón inmediatamente después de sacrificar al animal y se incubaron en tampón Ringer-Krebs saturado con oxígeno y se lavaron tres veces con tampón Ringer-Krebs. Se ligó una sección de 3,5 cm mediante seda quirúrgica y se llenó con 200 mL de mezcla de anticuerpos, que contenía 1 mg/mL de cada formato de anticuerpo (Infliximab y ESBA105). Se añadió una segunda ligadura distal aproximadamente 1 cm desde el saco evertido para asegurar que el compartimento fuera hermético. Los sacos evertidos se colocaron en vasos de precipitados de vidrio que contenían 10 mL de tampón Ringer-Krebs saturado de oxígeno de modo que solo las primeras ligaduras entraran en contacto con el tampón. Se añadieron inhibidores de proteasas a este compartimento receptor para evitar la degradación de los anticuerpos. Con el fin de determinar la cantidad de cada anticuerpo que penetró a través del tejido intestinal, se tomaron sondas de 200 mL del compartimento receptor después de puntos temporales definidos y se analizaron posteriormente mediante ELISA cuantitativo.

Ejemplo 7: Aplicación tópica de polipéptido de unión al antígeno soluble

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

Para estudiar la farmacodinámica de ESBA105 en el ojo, se utilizaron 6 conejos para cada formulación. La formulación se estudió en ambos ojos de los conejos. Se utilizaron dos conejos (4 ojos) para cada formulación sin fragmentos de anticuerpo, y se utilizaron dos conejos (4 ojos) como controles sin exposición previa. Se utilizaron 18 conejos en total para este estudio.

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

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

Se realizaron estudios adicionales para estudiar la solubilidad, farmacodinámica y farmacocinética de ESBA105. Los resultados se registran en las Figuras de 12 a 16. Como se puede observar en estas figuras, se ha mostrado que ESBA105 penetra a través de las capas de tejido corneal en conejos y cerdos. ESBA105 se acumula en el vítreo y tiene una semivida local de aproximadamente 25 horas. La semivida local de ESBA105 en la cámara anterior es significativamente menor que en el vítreo. La exposición sistémica tras el tratamiento tópico es extremadamente baja, por ejemplo, aproximadamente un 2% de la concentración local más elevada. Además, en función del experimento tópico en conejos se pueden alcanzar niveles terapéuticos de fármaco (aproximadamente 16 000 veces respecto a TNF) con tan solo 5 gotas tópicas al día. Por lo tanto, la aplicación tópica de los fragmentos de anticuerpo scFv inhibidor de TNF podrían ser una terapia eficaz en enfermedades ubicadas en los segmentos más posteriores del ojo, por ejemplo, el vítreo y la retina.

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

Para estudiar la respuesta a la dosis, se administró ESBA105 como se muestra en la Figura 17. Como comparación, se administró Remicade® (infliximab) 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 controles, se utilizaron 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 locales de fármaco 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 el acuoso, vítreo y suero. Se formuló ESBA105 como 10 mg/mL en PBS, pH 6,5. Para cada gota, se aplicaron 30 mL en la parte superior de la pupila y a continuación se presionó en los párpados para eliminar el fluido en exceso. Los resultados se muestran en la Figura 18 y Tabla 2.

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

	C _{máx}	Dosis total acumulada
Vitr.	4,0 ng/mL (6,6E-5%)	9 mg
Ac.	5,3 ng/mL (1,2E-5%)	9 mg
Suero	14,2 ng/mL (0,3%)	9 mg

Ejemplo 10: Aplicación tópica de polipéptido de unión al antígeno soluble

Para determinar la exposición sistémica máxima y los niveles locales de fármaco durante un tratamiento tópico crónico 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 mL de ESBA105 en el saco ocular inferior (presentación del fármaco principalmente a la esclerótica), y la totalidad de los 30 mL permanecieron en la superficie ocular.

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 el acuoso, vítreo, neurorretina, coroides y suero. Los resultados de este estudio se representan gráficamente en las Figuras de 19a a 19e.

La Tabla 3 resume las concentraciones de scFv ESBA105 medianas detectadas tras el 6.º día de administración en los compartimentos indicados en [ng/mL].

Tabla 3: Concentraciones de scFv ESBA105 medianas detectadas tras el 6.º día de administración.

	Acuoso	Vítreo	Neurorretina	Coroides	Suero
Concentración de scFv mediana después del 6.º día [ng/ml]	~100	~350	~300	~100	<1

Se debe interpretar esta memoria descriptiva solamente como ilustrativa y tiene el objetivo de mostrar a los expertos en la técnica el mejor modo de llevar a cabo la presente invención. Se pretende que la presente invención está limitada solamente en la medida requerida por las reivindicaciones adjuntas y las reglas aplicables de la ley.

En caso de que uno o más de los elementos bibliográficos citados y materiales similares difieran o contradigan esta solicitud, incluidos los términos definidos, uso del término, técnicas descritas o similares, prevalecerá esta solicitud.

Los encabezamientos de las secciones que se utilizan en la presente solo tienen fines organizativos y no se deben interpretar como limitantes de la materia descrita de ninguna manera.

Aunque la presente invención se ha descrito junto con diversas realizaciones y ejemplos, no se pretende que el contenido de la presente esté limitado por tales realizaciones o ejemplos.

Referencias:**[0159]**

- 5
 Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J.,
 Roberts, K. y Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4.^a ed.
- 10
 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. y Lipman, D.J. (1990) «Basic local alignment search tool». *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- 15
 Auf der Maur, A., Escher, D. y Barberis, A. (2001). Antigen-independent selection of stable intracellular single-chain 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.
- 20
 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.
- 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 previa a la impresión.
- 25
 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.
- 30
 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.
- 35
 Chothia, C. y Lesk, A. M. (1987). Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol* 196, 901-917.
- 40
 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
- 45
 Dick, AD. *et al.* (1997) Immunosuppressive therapy for chronic uveitis:optimising therapy with steroids and cylosporin A. *Br. J. Ophthalmol.* 81, 1107-1112
- 50
 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.
- 55
 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
- 60
 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.
- Holliger, P. y Hudson, P. (2005), *Nat. Biotechnol.* 23(9), pp. 1126-1136.
- 5 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.
- 10 Joseph, A. *et al.* (2003) Infliximab in the treatment of refractory posterior uveitis. *Ophthalmology* 110, 1449-1453
- 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.
- 15 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
- 20 Lindstedt *et al.* (2005). Anti-TNF-alpha therapy for sight threatening uveitis. *Br J Ophthalmol* 89(5), 533-536.
- Murphy, CC. *et al.* (2004) Neutralizing tumor necrosis factor activity leads to remission in patients with refractory noninfectious posterior uveitis. *Arch. Ophthalmol.* 122, 845-851.
- 25 Özen (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.
- 30 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.
- 35 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
- 40 Rosenbaum (2004). Blind insight: Eyeing anti-tumor necrosis factor treatment in uveitis associated with Behçet's disease. *J Rheumatol* 31(7), 1241-1243.
- 45 Sakane *et al.* (1999). Behcet's disease. *N Engl J Med* 341, 1284-1291.
- 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): págs. 202-206, 2004.
- 50 Sfrikakis, PP. *et al.* (2001) Effect of infliximab on sight-threatening pan-uveitis in Behcet's disease. *Lancet* 358, 295-296.
- Suhler *et al.* (2005). A prospective trial of infliximab therapy for refractory uveitis: preliminary safety and efficacy outcomes. *Arch Ophthalmol* 123(7), 903-912.
- 55 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.
- 60 Tugal-Tutkun *et al.* (2004). Uveitis in Behçet's disease: an analysis of 880 patients. *Am J Ophthalmol* 138, 373-380.
- 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.
- 65 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.

5 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 Supl 34), S14-S16.

10

Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania 1987

Wörn, 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.

15

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.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ESBATech, an Alcon Biomedical Research Unit LLC

<120> Anticuerpos scFv que pasan las capas epitelial y/o endotelial

<130> EP791751FZRPpau

<140> Aún no se ha asignado

<141> 10/07/2007

<150> 07763939.1

<151> 2007-07-10

<150> PCT/CH2007/000334

<151> 2007-07-10

<150> US 60/899,907

<151> 2007-02-06

<150> US 60/819,378

<151> 2006-07-10

<160> 21

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> VL del tipo kappa 1

<400> 1

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

ES 2 820 837 T3

<212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> VL del tipo kappa 1

<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

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

<220>
 <223> VL del tipo kappa 3

<400> 3

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

ES 2 820 837 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
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<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
<211> 109
<212> PRT

ES 2 820 837 T3

<213> Artificial

<220>

<223> VL del tipo lambda 3

<400> 7

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

<210> 8

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial

<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

ES 2 820 837 T3

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

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

<220>
 <223> VH del tipo H3

<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

<210> 10
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> VH del tipo H3

ES 2 820 837 T3

<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

<210> 11

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial

<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

ES 2 820 837 T3

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

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

<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

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 Gly Ser
115 120 125

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

ES 2 820 837 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 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
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> TB-WT

<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

ES 2 820 837 T3

Tyr Ser Ala Phe Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 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 Gly
 100 105 110
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser 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
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> scFv Lucentis

<400> 15

ES 2 820 837 T3

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
 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 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
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> conector

ES 2 820 837 T3

<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

<210> 17

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> conector

<400> 17

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 18

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> ESBA105-QC15.2

<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

ES 2 820 837 T3

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
145 150 155 160

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg 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 Ile 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> 19
<211> 245
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ESBA105-H_F68A

<400> 19

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

ES 2 820 837 T3

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
 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
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

ES 2 820 837 T3

<223> TB-H_F70L

<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

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monocatenario (scFv) que comprende:

5 (a) un dominio variable de la cadena ligera (VL) que tiene tres regiones CDR de VL no humanas y regiones de armazón de VL con una identidad secuencial de al menos un 85% con las regiones de armazón de VL de un dominio variable de la cadena ligera seleccionadas del grupo que consiste en: las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7; y

10 (b) un dominio variable de la cadena pesada (VH) que tiene tres regiones CDR de VH no humanas y regiones de armazón de VH con una identidad secuencial de al menos un 85% con las regiones de armazón de VH de un dominio variable de la cadena pesada seleccionadas del grupo que consiste en: las SEQ ID NOs: 8, 9, 10 y 11,

15 donde dicho anticuerpo monocatenario (scFv) es capaz de cruzar una córnea de mamífero intacta en menos de 8 horas en ausencia de un potenciador de la penetración.

20 2. El anticuerpo monocatenario (scFv) de la reivindicación 1, que comprende un elemento de armazón del dominio variable de la cadena ligera (VL) con una identidad secuencial de al menos un 95% con la secuencia de armazón de la SEQ ID NO: 1, y un elemento de armazón del dominio variable de la cadena pesada (VH) con una identidad secuencial de al menos un 95% con la secuencia de armazón de la SEQ ID NO: 11.

25 3. El anticuerpo monocatenario (scFv) de la reivindicación 1 o 2, cuya afinidad por su antígeno está caracterizada por una constante de disociación KD inferior a 100 nM.

4. El anticuerpo monocatenario (scFv) de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el anticuerpo monocatenario (scFv) tiene especificidad por un TNF α humano.

5. El anticuerpo monocatenario (scFv) de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4, que está modificado químicamente.

30 6. El anticuerpo monocatenario (scFv) de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el anticuerpo monocatenario (scFv) sigue siendo estable durante al menos ocho semanas.

35 7. El anticuerpo monocatenario (scFv) de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el anticuerpo monocatenario (scFv) sigue siendo estable durante al menos seis semanas a 4 grados Celsius.

8. El anticuerpo monocatenario (scFv) de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el anticuerpo monocatenario (scFv) sigue siendo estable durante 1 mes, preferentemente al menos dos meses, de la manera más preferida al menos seis meses de 20 °C a 40 °C, preferentemente a 37 °C en PBS.

40 9. El anticuerpo monocatenario (scFv) de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el anticuerpo monocatenario (scFv) es soluble a temperatura ambiente en PBS a concentraciones superiores a 1 mg/mL, preferentemente superiores a 4 mg/mL, más preferentemente superiores a 10 mg/mL, aún más preferentemente superiores a 25 mg/mL o de la manera más preferente superiores a 50 mg/mL.

45 10. El anticuerpo monocatenario (scFv) de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el anticuerpo monocatenario (scFv) revela un punto medio de transición en una titulación con clorhidrato de guanidinio de al menos 1,5 M, preferentemente al menos 1,75 M, más preferentemente al menos 1,9 M o de la manera más preferente al menos 2 M.

50 11. Una molécula polinucleotídica aislada que codifica el anticuerpo monocatenario (scFv) de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

55 12. Un vector de clonación o expresión que comprende la molécula polinucleotídica aislada de acuerdo con la reivindicación 11.

13. Una célula hospedadora adecuada transformada con un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 12, preferentemente donde la célula hospedadora es una célula procariota o eucariota, en particular una célula de *E. coli*, levadura, de plantas, de insectos o de mamífero.

60 14. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monocatenario (scFv) de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, preferentemente donde:

(a) la composición farmacéutica se formula para la aplicación tópica en las membranas mucosas, piel u ojo;

- (b) la composición farmacéutica se formula para la inyección intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intratecal o intraperitoneal;
- 5 (c) la composición farmacéutica se formula como una formulación de liberación lenta, prolongada o en el tiempo, una formulación portadora tal como microesferas, microcápsulas o liposomas;
- (d) la composición farmacéutica comprende el anticuerpo monocatenario (scFv) de la reivindicación 1 formulada para conseguir una concentración intraocular de al menos 100 ng/mL o más;
- 10 (e) la composición farmacéutica se formula para la administración tópica para generar una concentración intraocular de 100 ng/mL o más basándose en un sistema modelo en animales o celular;
- (f) la composición farmacéutica se formula para seguir siendo soluble a concentraciones elevadas; o
- 15 (g) la composición farmacéutica se formula para la aplicación tópica en el ojo y es capaz de pasar a través de la córnea y adentrarse en el espacio intraocular en ausencia de un potenciador de la penetración.
- 20 15. El anticuerpo monocatenario (scFv) de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o la composición farmacéutica de la reivindicación 14, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno, en particular una enfermedad o trastorno del ojo, la piel o el intestino.

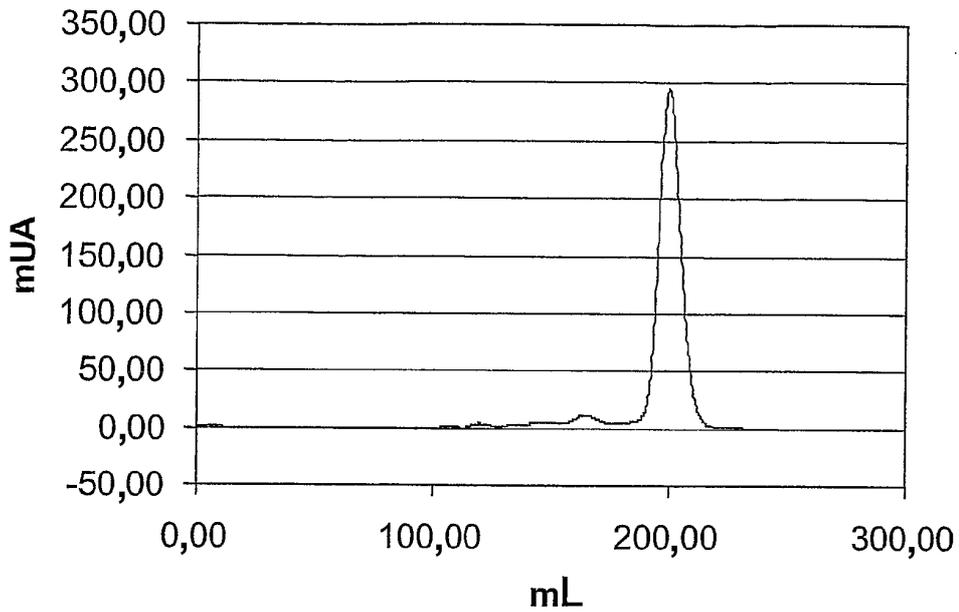


Fig. 1A

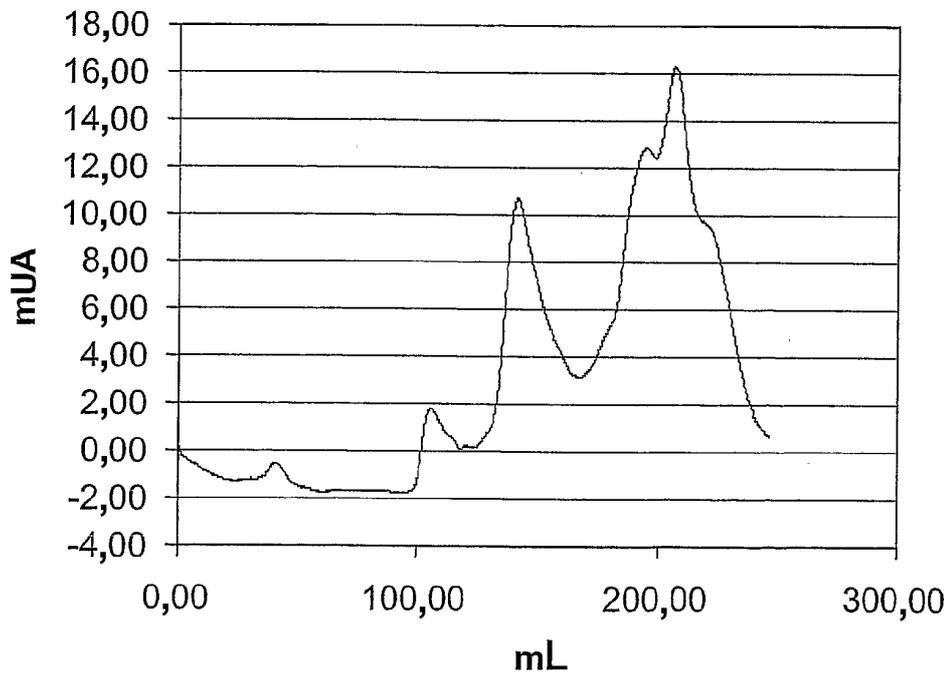


Fig. 1B

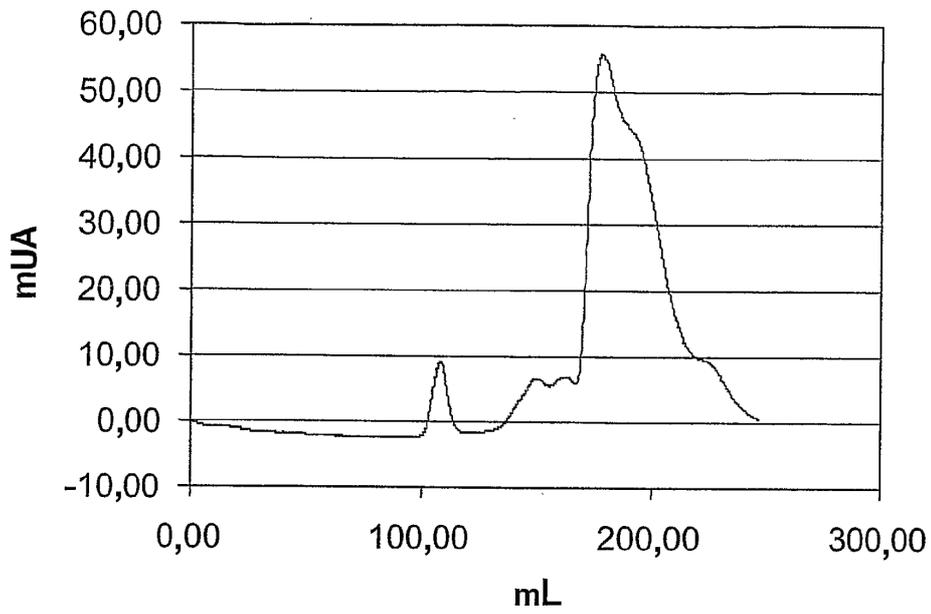


Fig. 1C

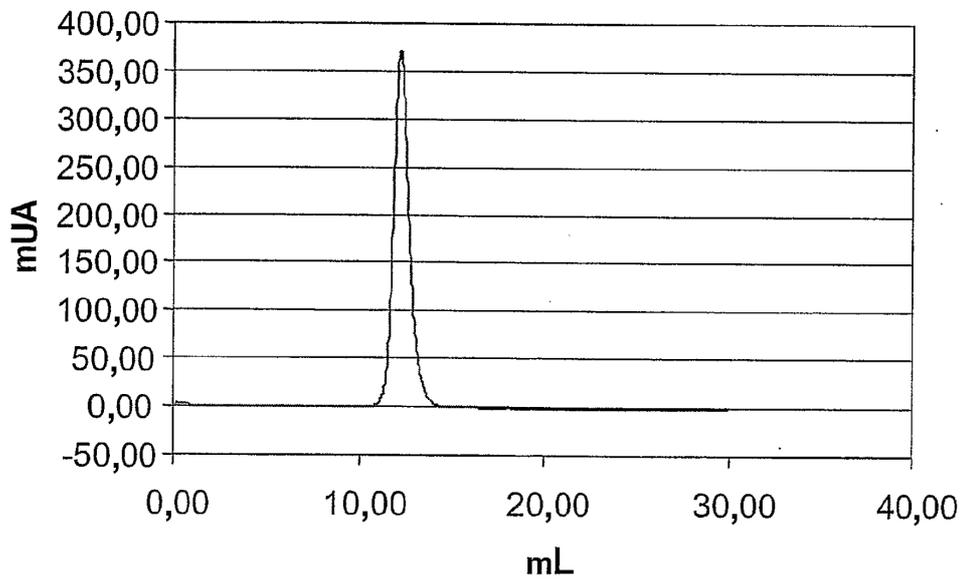


Fig. 2

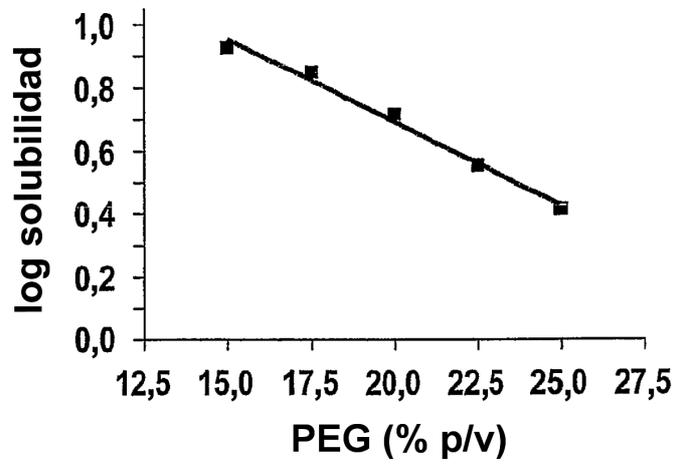


Fig. 3

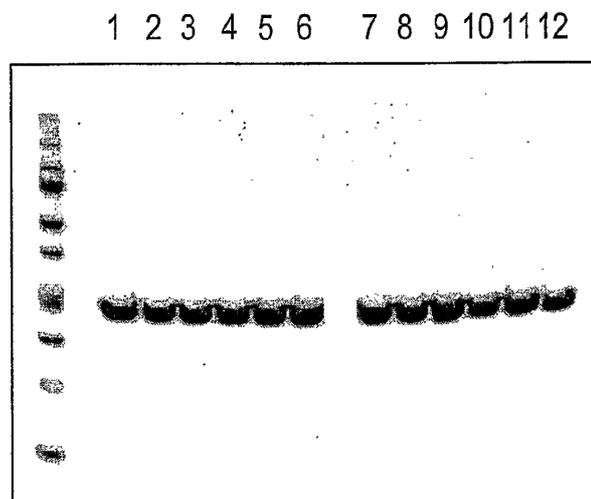


Fig. 4

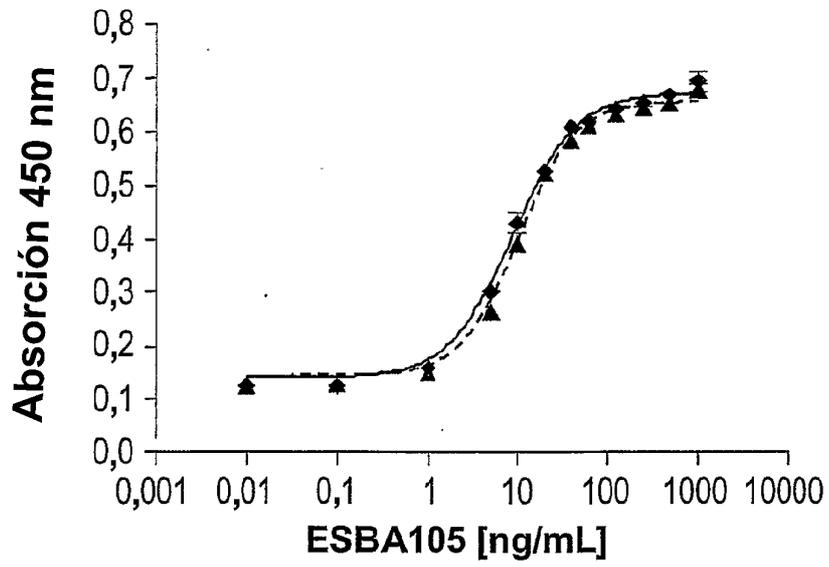


Fig. 5

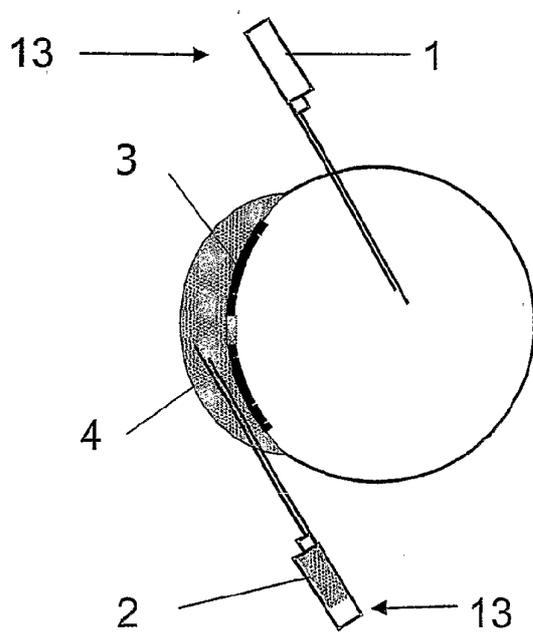


Fig. 6

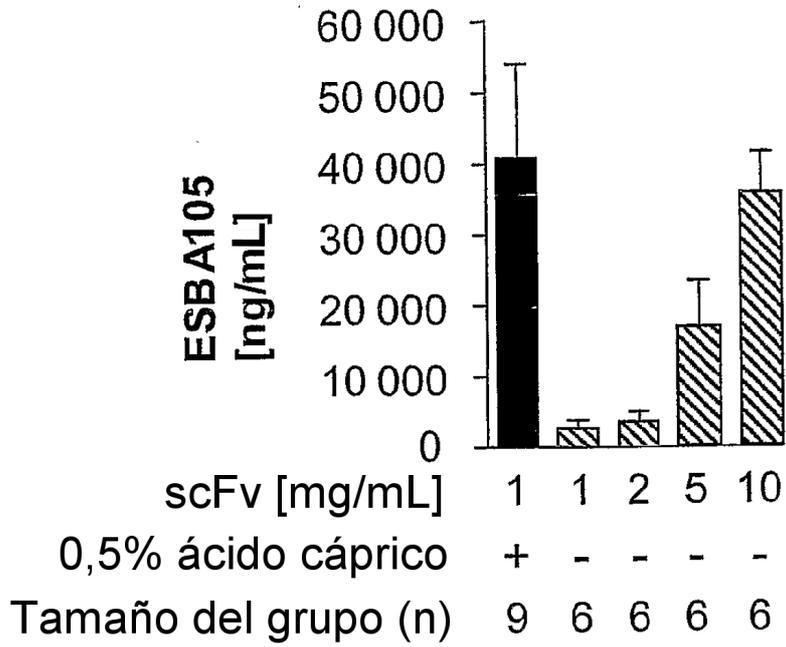


Fig. 7

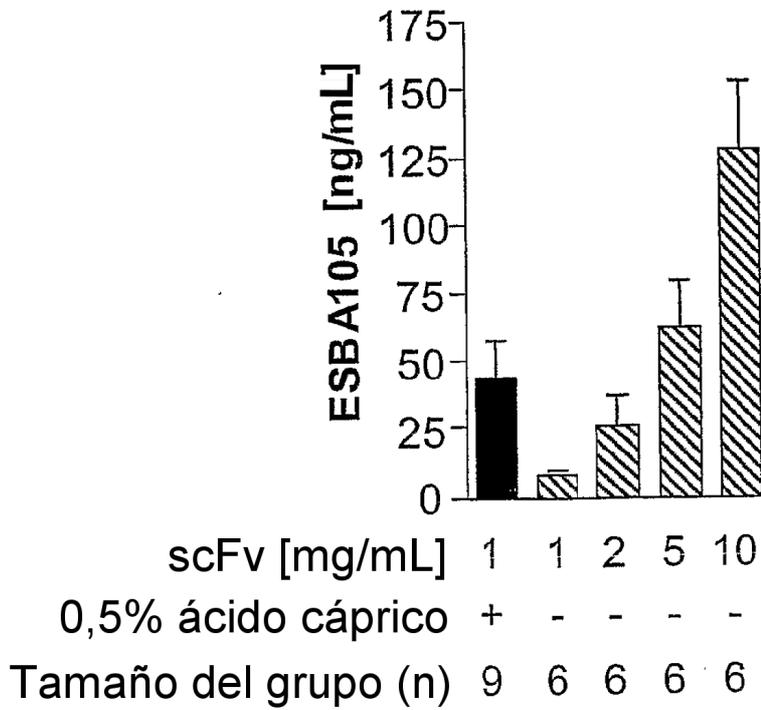


Fig. 8

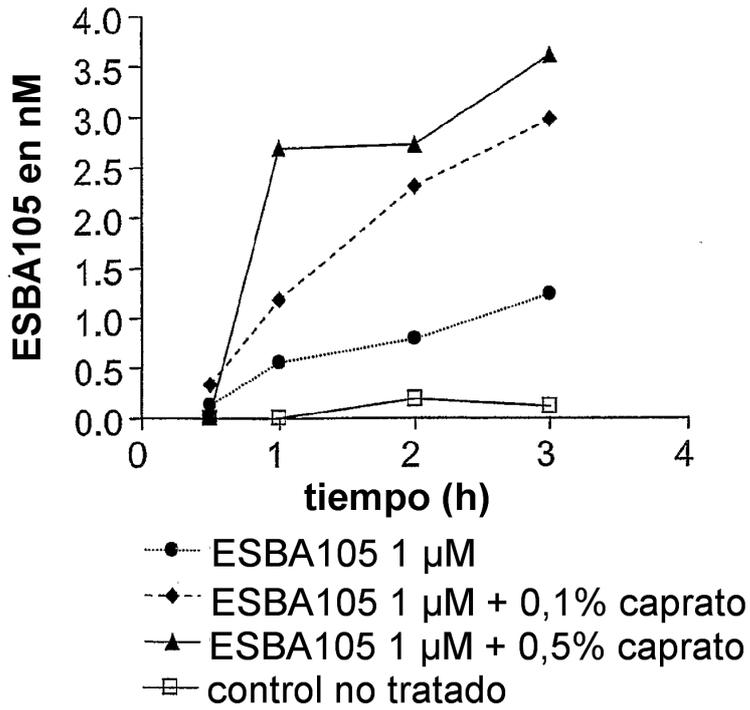


Fig. 9

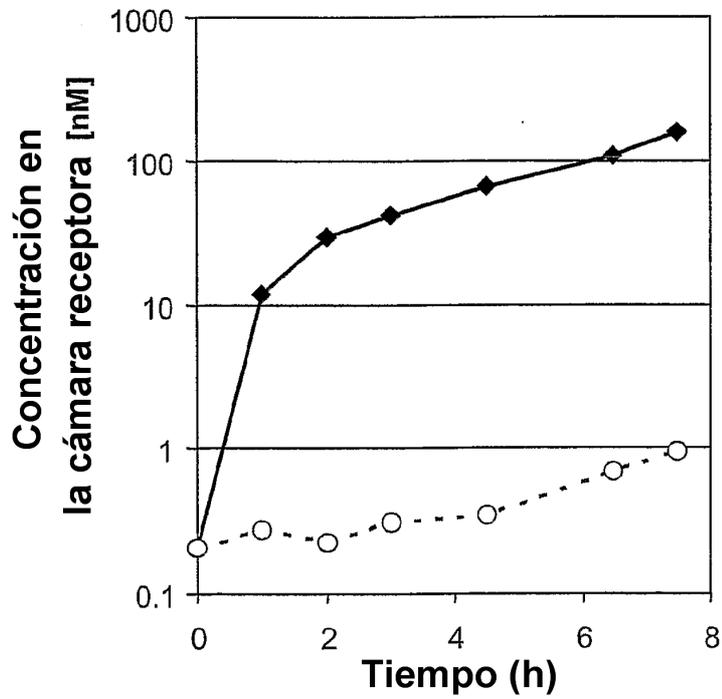


Fig. 10

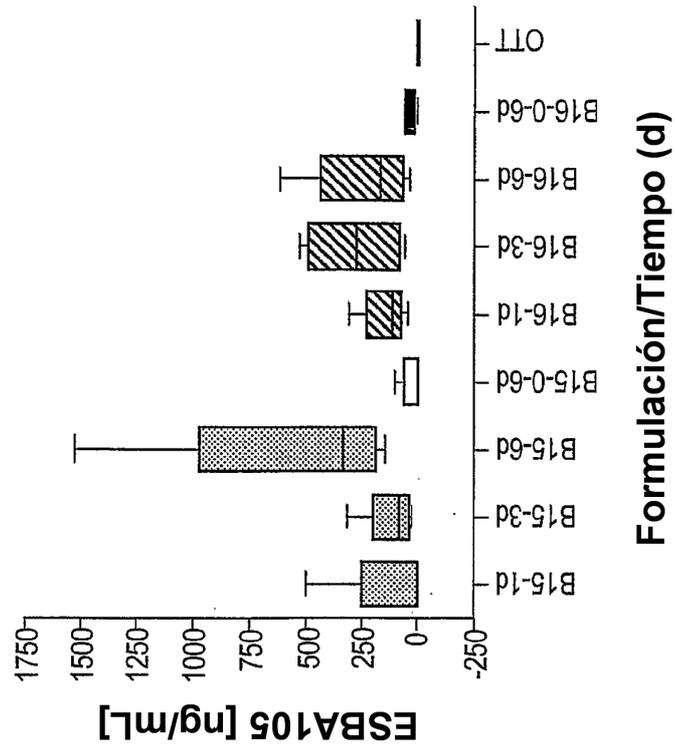


Fig. 11a

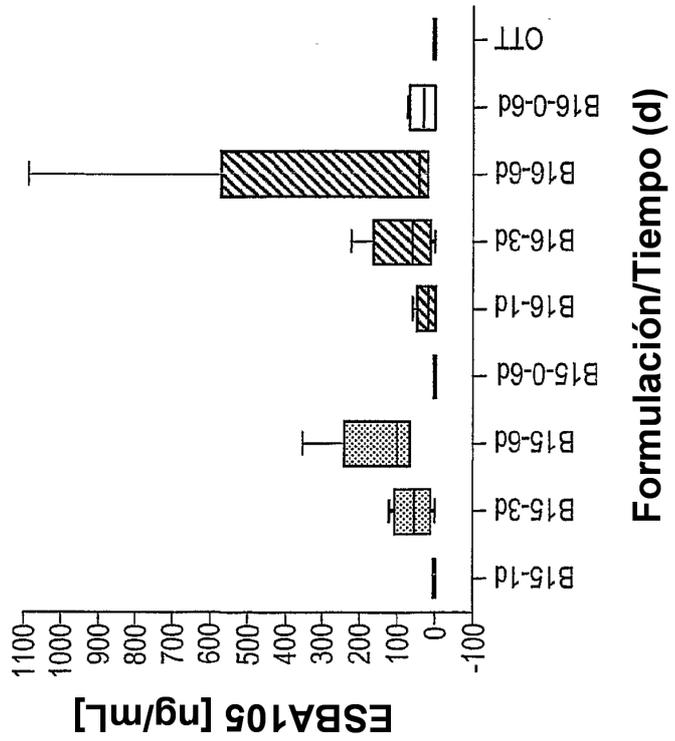


Fig. 11b

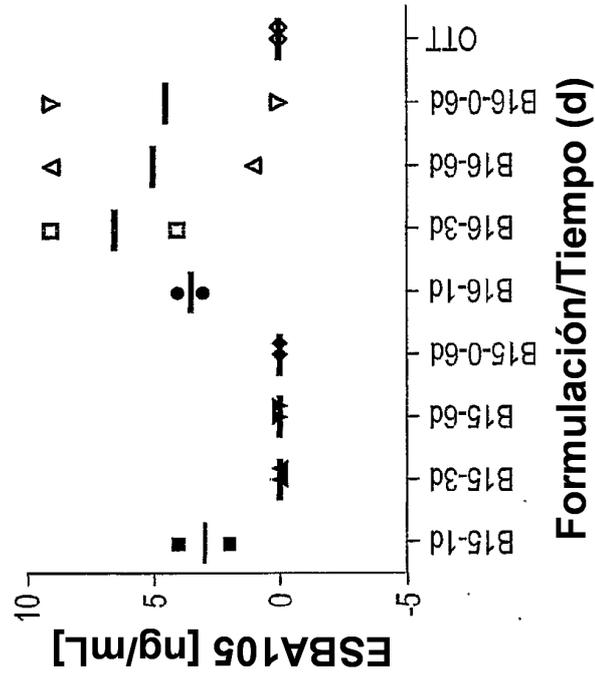


Fig. 11d

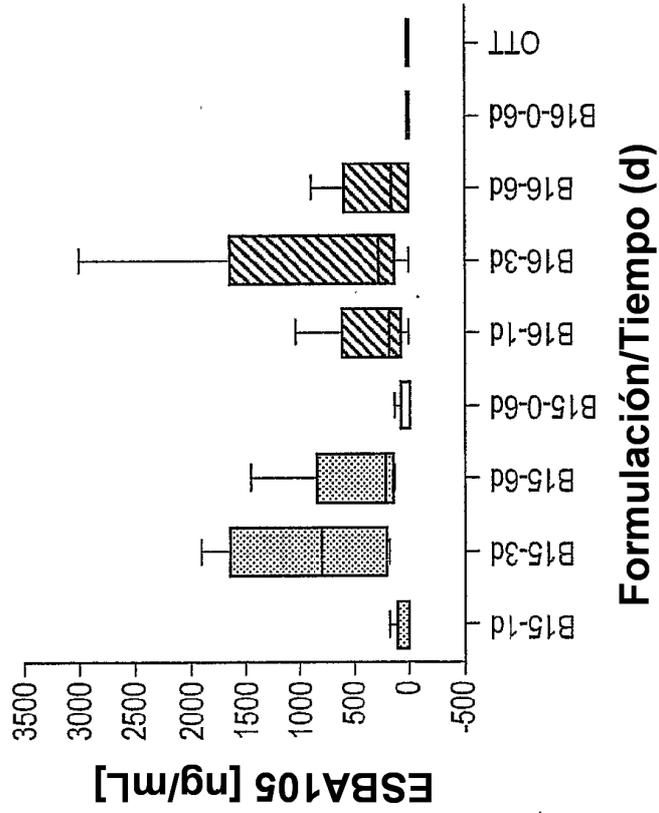


Fig. 11c

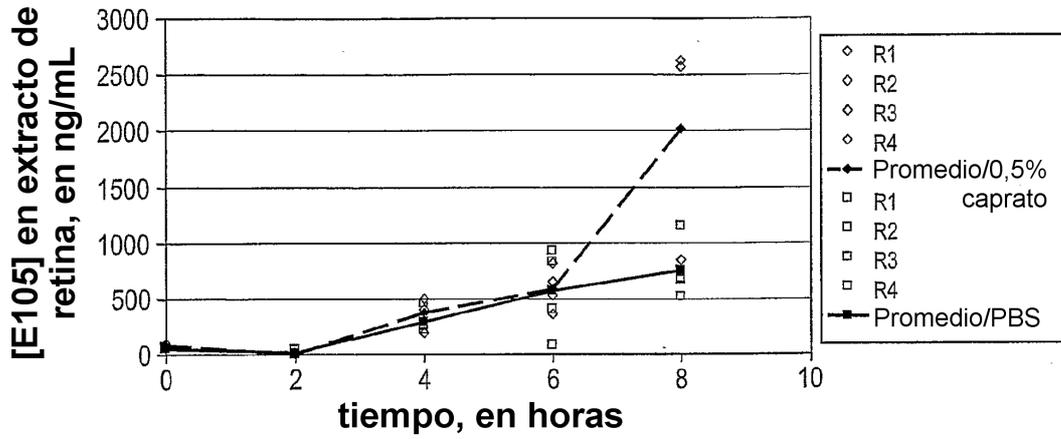


Fig. 12

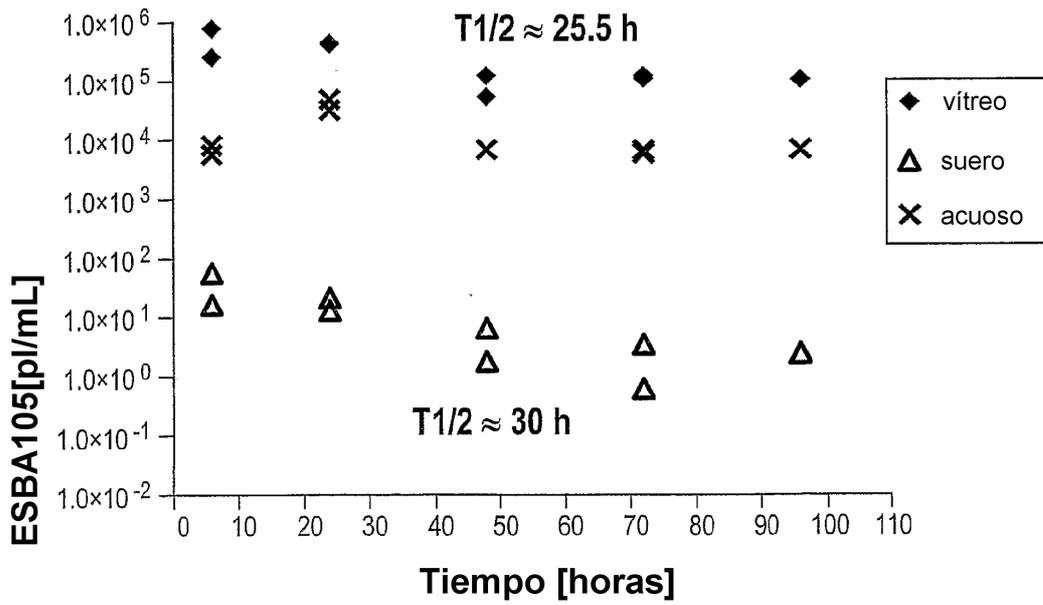


Fig. 13

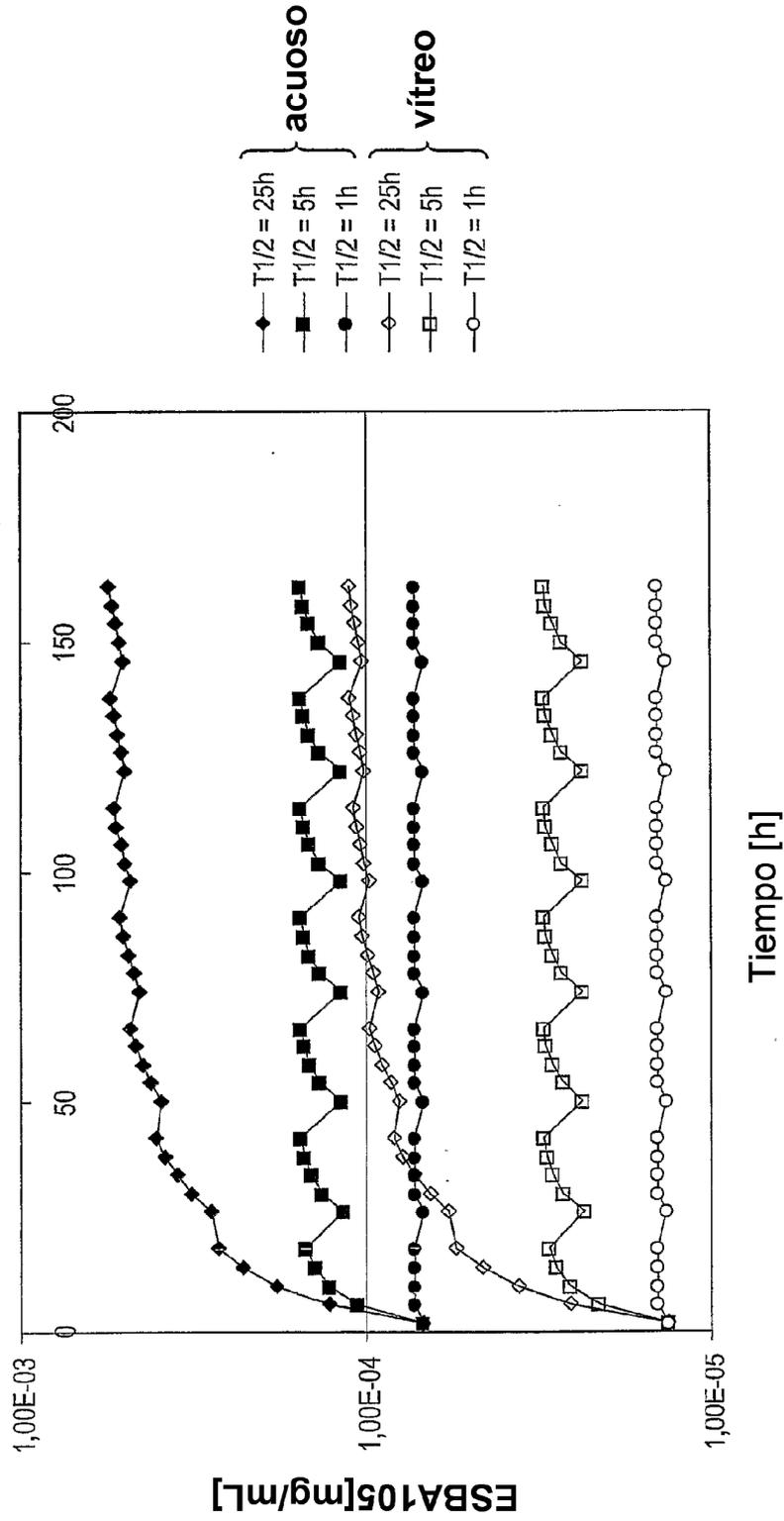


Fig. 14

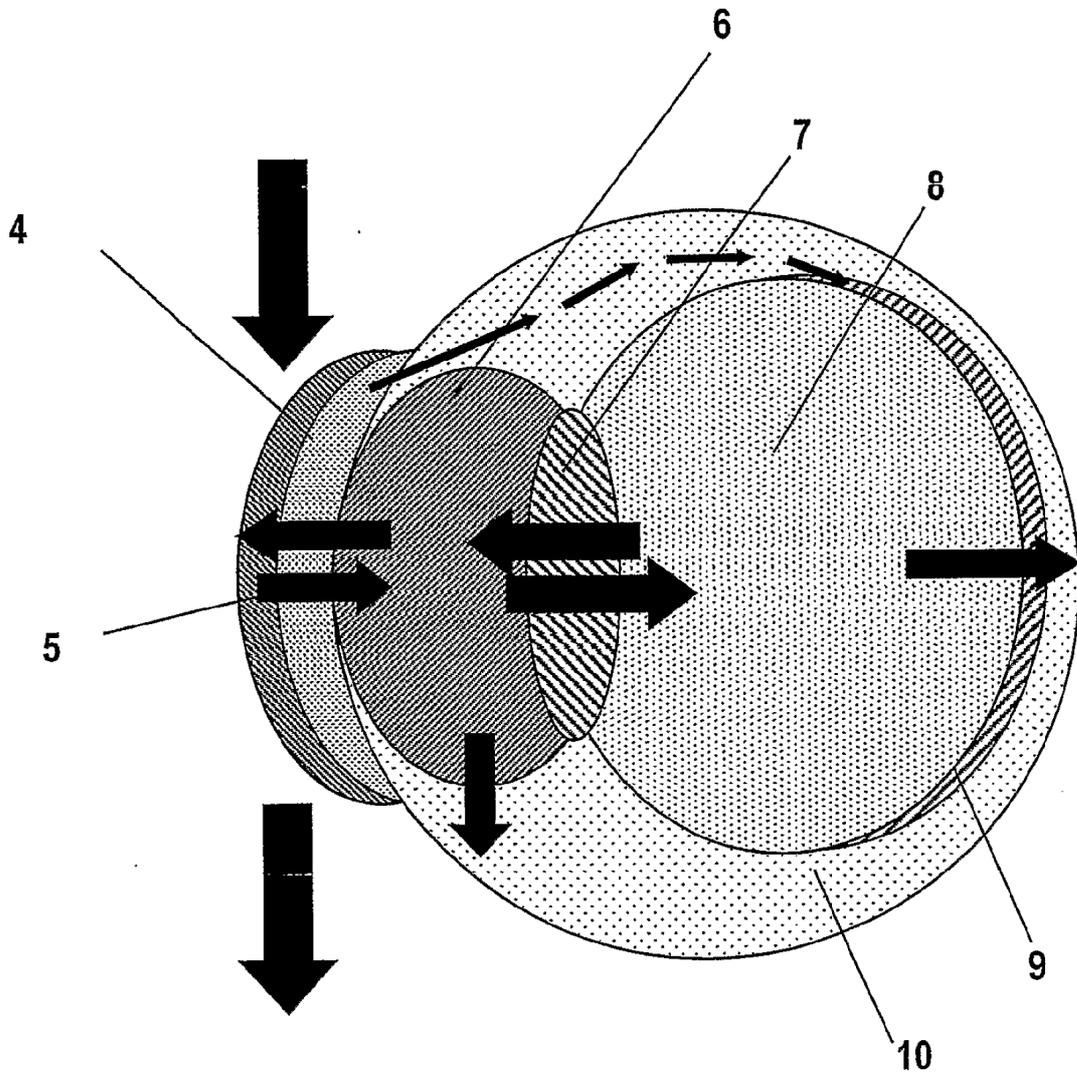


Fig. 15

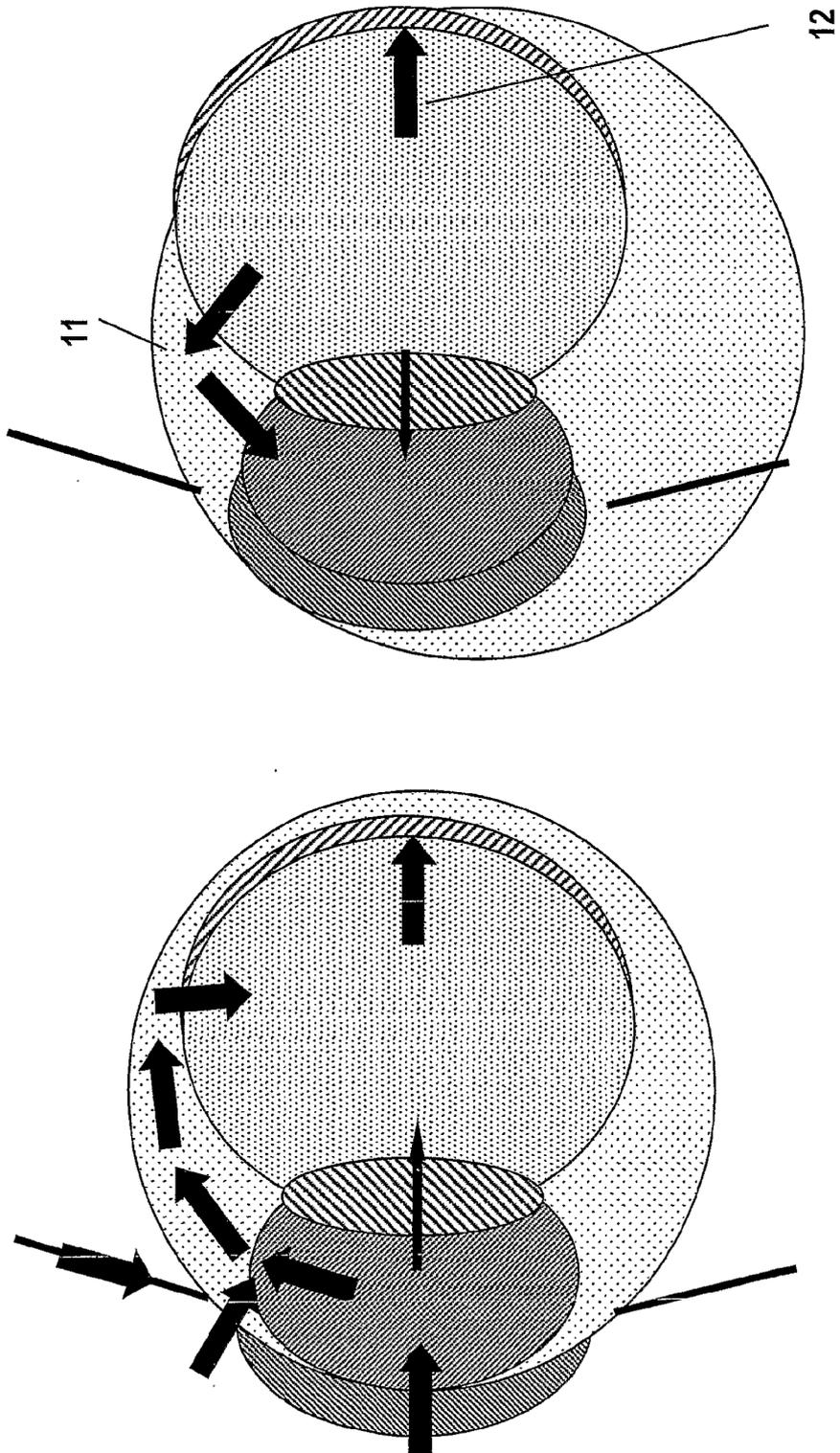


Fig. 16

Fig. 17

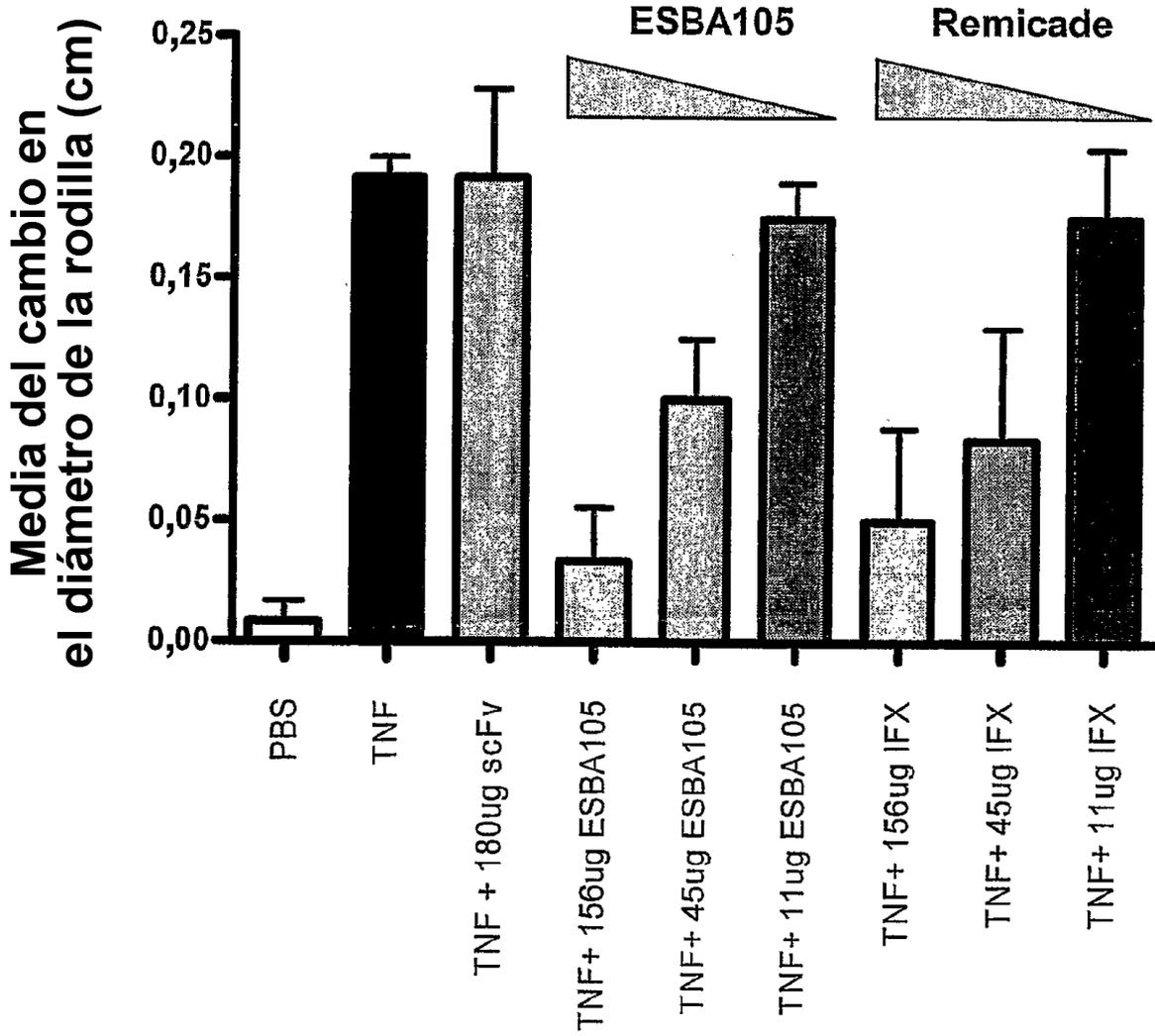


Fig. 18 A

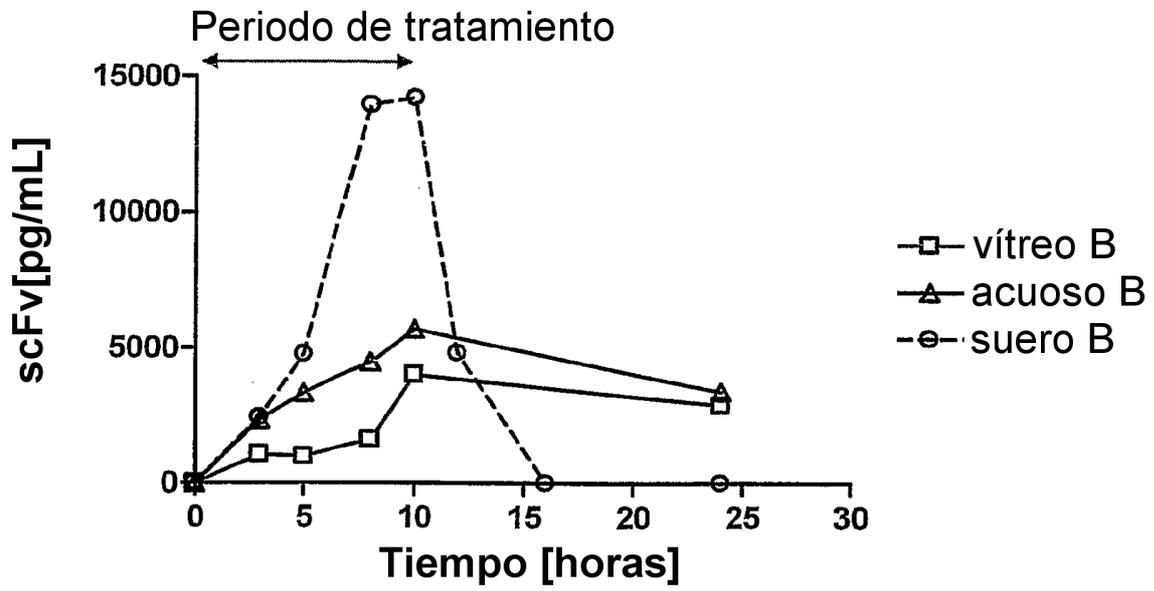


Fig. 19 A

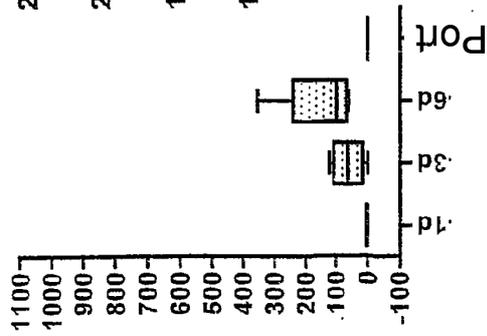


Fig. 19 B

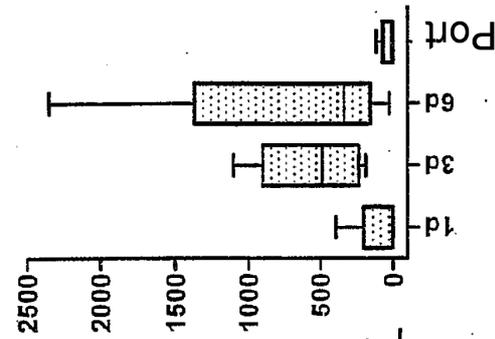


Fig. 19 C

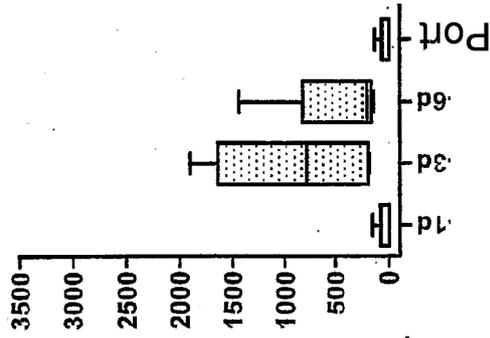


Fig. 19 D

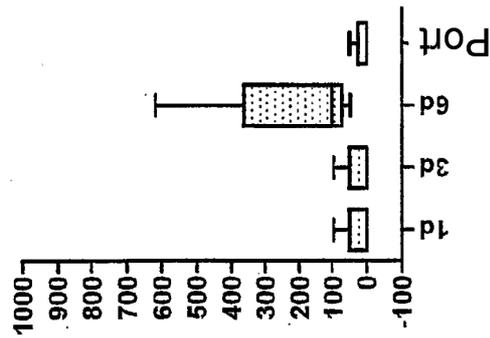


Fig. 19 E

