

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 302**

51 Int. Cl.:

A61K 9/48	(2006.01)	A61P 35/00	(2006.01)
C12N 5/10	(2006.01)		
C12N 15/85	(2006.01)		
A61K 48/00	(2006.01)		
A61K 9/00	(2006.01)		
A61P 27/02	(2006.01)		
A61P 9/10	(2006.01)		
A61P 27/06	(2006.01)		
A61P 7/00	(2006.01)		
A61P 29/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2011 PCT/US2011/062704**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2012 WO2012075184**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2011 E 11844999 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2646007**

54 Título: **Líneas celulares que segregan estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas y receptores solubles y usos de los mismos**

30 Prioridad:

02.12.2010 US 419138 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.05.2017

73 Titular/es:

**NEUROTECH USA, INC. (100.0%)
900 Highland Corporate Drive Building No. 1
Suite No. 101
Cumberland, RI 02864, US**

72 Inventor/es:

**LING, VINCENT;
NYSTUEN, AME, M.;
TAO, WENG;
STABILA, PAUL, FRANCIS y
KAUPER, KONRAD**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 613 302 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

Líneas celulares que segregan estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas y receptores solubles y usos de los mismos

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere en general al campo de las terapias con células encapsuladas.

Antecedentes de la invención

10 Muchas condiciones clínicas, deficiencias y estados de enfermedad pueden remediarse o aliviarse mediante el suministro al paciente de una o más moléculas biológicamente activas producidas por células vivas o mediante la eliminación de factores nocivos para el paciente que se metabolizan por las células vivas. En muchos casos, estas moléculas pueden restaurar o compensar el deterioro o la pérdida de la función del órgano o tejido. Por consiguiente, muchos investigadores han tratado de reconstituir la función del órgano o del tejido mediante el trasplante de órganos enteros, tejidos de órganos, y/o células, que proporcionan productos secretados o afectan a las funciones metabólicas. Sin embargo, aunque tales trasplantes puedan proporcionar beneficios drásticos, están limitados en su aplicación por el número relativamente pequeño de órganos que son adecuados y que están disponibles para el injerto. Además, en general, los pacientes de trasplantes deben estar inmunodeprimidos con el fin de evitar el rechazo inmunológico del trasplante, lo que resulta en una pérdida de la función del trasplante y una eventual necrosis del tejido o de las células trasplantadas. Del mismo modo, en muchos casos, el trasplante debe seguir siendo funcional durante un largo período de tiempo, incluso para el resto de la vida del paciente. Es a la vez indeseable y costoso mantener un paciente en un estado inmunodeprimido durante un período de tiempo sustancial.

20 Un ejemplo en el que terapias eficaces adicionales son todavía necesitadas son los trastornos del ojo que amenazan a la visión. Un problema importante en el tratamiento de dichas enfermedades es la incapacidad de administrar agentes terapéuticos dentro del ojo, debido a la presencia de la barrera sangre-retina, y de mantenerlos allí a concentraciones terapéuticamente eficaces.

25 Muchos factores de crecimiento han demostrado ser prometedores en el tratamiento de la enfermedad ocular. Por ejemplo, BDNF y CNTF han demostrado retrasar la degeneración de las células ganglionares de la retina y disminuir la degeneración de los fotorreceptores en diversos modelos animales. Véase, por ejemplo, Genetic Technology News, vol. 13, no. 1 (Ene. 1993). Además, el factor de crecimiento nervioso ha mostrado que mejora la supervivencia de células ganglionares de la retina después de la sección del nervio óptico y también se ha demostrado que promueve la recuperación de las neuronas retinales después de la isquemia. Véase, por ejemplo, Siliprandi, y col., Invest. Ophthalmol. & Vis. Sci., 34, pp. 3232-3245 (1993). Más recientemente, sustancias biológicas a base de estructuras de anticuerpos se han diseñado y utilizado para los trastornos oculares incluyendo, por ejemplo, anticuerpos completos (por ejemplo, bevacizumab) y fragmentos Fab de estructuras de anticuerpo (por ejemplo, ranibizumab), y Fc de inmunoglobulina (por ejemplo, Aflibercept).

35 Una alternativa deseable para los procedimientos de trasplante es la implantación de células o tejidos dentro de una barrera física que permitirá la difusión de nutrientes, metabolitos y productos secretados, pero que bloqueará los efectores celulares y moleculares de rechazo inmunológico. Una variedad de dispositivos que protegen los tejidos o células que producen un producto seleccionado del sistema inmune han sido explorados. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.158.881; documento WO92/03327; documento WO91/00119; y documento WO93/00128.

40 Estos dispositivos incluyen, por ejemplo, cámaras de difusión extravascular, cámaras de difusión intravascular, cámaras de ultrafiltración intravascular, y la implantación de células microencapsuladas. Véase Scharp, D. W., et al., World J. Surg., 8, pp. 221-9 (1984). Véase, por ejemplo, Lim et al., Science 210: 908-910 (1980); Sun, A. M., Methods in Enzymology 137: 575-579 (1988); el documento WO 93/03901; y la patente de EE.UU. N° 5.002.661. El uso de tales dispositivos aliviaría la necesidad de mantener al paciente en un estado de inmunodepresión. Sin embargo, ninguno de estos enfoques ha sido satisfactorio para proporcionar la función del trasplante a largo plazo.

45 Por lo tanto, se necesitan métodos de administración de cantidades apropiadas de sustancias necesarias, tales como, por ejemplo, factores neurotróficos, factores anti-angiogénicos, factores anti-inflamatorios, enzimas, hormonas, u otros factores, o proporcionar otras funciones metabólicas necesarias, en el ojo u otras partes del cuerpo durante un período prolongado de tiempo.

Sumario de la invención

55 Se proporciona en este documento una línea celular y un dispositivo de cultivo celular implantable como se define en las reivindicaciones adjuntas. También se describen ácidos nucleicos aislados que codifican proteínas anti-angiogénicas que incluyen estructuras de anticuerpos, receptores del factor de crecimiento endotelial vascular soluble (VEGF), y/o receptores de factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) en los que los ácidos nucleicos comprenden o consisten en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO:

17, SEQ ID NO: 19, SEQ JD NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, y SEQ ID NO: 31. También se describen moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, y SEQ ID NO: 32.

También se describen moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que tiene una secuencia que es al menos 95% idéntica a cualquiera de las SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 ó 32. Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico pueden ser el complemento de una molécula de ácido nucleico tal. Tal como se utiliza en este documento, la expresión "molécula de ácido nucleico" se pretende que incluya moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), análogos del ADN o ARN generados utilizando análogos de nucleótidos, y derivados, fragmentos y homólogos de los mismos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es ADN de doble cadena.

Como se usa en este documento, una molécula de ácido nucleico "aislada" es una que está separada de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente del ácido nucleico. Preferiblemente, un ácido nucleico "aislado" está libre de secuencias que flanquean el ácido nucleico (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del que se deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, en diversas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb, o 0,1 kb de secuencias de nucleótidos que flanquean la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la que se deriva el ácido nucleico. Por otra parte, una molécula "aislada" de ácido nucleico, tal como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente libre de otro material celular o medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o de precursores químicos u otros productos químicos, cuando se sintetiza químicamente. Por ejemplo, los expertos en la técnica reconocerán que el ácido nucleico "aislado" puede ser una molécula totalmente sintética que provenga originalmente del cribado de presentación de fagos. Por lo tanto, en este contexto, un ácido nucleico "aislado" puede ser una molécula sintética sustancialmente libre de otro material celular, medio de cultivo, precursores químicos, productos químicos, etc.

Una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, y SEQ ID NO: 31, que codifica un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, y SEQ ID NO: 32 o un complemento de cualquiera de estas secuencias de nucleótidos) se puede hacer usando técnicas de biología molecular estándar y la información de secuencia proporcionada en este documento. Usando la totalidad o una parte de estas secuencias de ácido nucleico, una sonda de hibridación, o un receptor de VEGF soluble o moléculas del receptor de PDGF se pueden aislar usando técnicas de hibridación y clonación estándar (por ejemplo, como se describe en Sambrook et al, (eds), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; y Ausubel, et al., (eds.), *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY, 1993.)

Cualquiera de los ácidos nucleicos puede amplificarse usando ADNc, ARNm o, alternativamente, ADN genómico, como plantilla y cebadores de oligonucleótidos apropiados de acuerdo con técnicas de amplificación de PCR y de ensamblaje estándar. El ácido nucleico así amplificado se puede clonar en un vector apropiado y caracterizarse por análisis de secuencia de ADN. Además, los oligonucleótidos correspondientes a secuencias de nucleótidos de estructura de anticuerpos anti-angiogénica o VEGFR o PDGFR solubles se pueden preparar por técnicas sintéticas estándar, por ejemplo, utilizando un sintetizador de ADN automatizado.

Tal como se utiliza en este documento, el término "oligonucleótido" se refiere a una serie de residuos de nucleótidos unidos, cuyo oligonucleótido tiene un número suficiente de bases de nucleótidos que se utilizan en una reacción de PCR. Una secuencia de oligonucleótidos corta puede basarse o diseñarse a partir de una secuencia genómica o de ADNc y se utiliza para amplificar, confirmar o revelar la presencia de un ADN o ARN idéntico, similar o complementario en una célula o tejido particular.

Los oligonucleótidos comprenden porciones de una secuencia de ácido nucleico que tienen aproximadamente 10 nt, 50 nt, o 100 nt de longitud, preferiblemente de aproximadamente 15 nt a 30 nt de longitud. Un oligonucleótido que comprende una molécula de ácido nucleico de menos de 100 nt de longitud comprendería además al menos 6 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, o 31, o un complemento del mismo. Los oligonucleótidos pueden ser sintetizados químicamente y pueden ser utilizados como sondas.

Una molécula de ácido nucleico aislada comprende una molécula de ácido nucleico que es un complemento de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, o 31. Una molécula de ácido nucleico que es complementaria a estas secuencias de nucleótidos es una que es

suficientemente complementaria a la secuencia de nucleótidos que puede formar enlaces de hidrógeno con pocas falta de coincidencias o sin éstas, formando con ello una doble hélice estable.

Tal como se utiliza en este documento, el término "complementario" se refiere al apareamiento de bases de Watson-Crick o Hoogsteen entre las unidades de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico, y el término "unión" se refiere a la interacción física o química entre dos polipéptidos o compuestos o polipéptidos asociados o compuestos o combinaciones de los mismos. La unión incluye iónica, no iónica, Van der Waals, interacciones hidrófobas, etc. Una interacción física puede ser directa o indirecta. Las interacciones indirectas pueden ser a través o debido a los efectos de otro polipéptido o compuesto. La unión directa se refiere a interacciones que no tienen lugar a través de, o debido a, el efecto de otro polipéptido o compuesto, sino que son sin otros intermediarios químicos sustanciales.

Por otra parte, la molécula de ácido nucleico puede comprender sólo una porción de la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, o 31, por ejemplo, un fragmento que puede utilizarse como sonda o iniciador o un fragmento que codifica una porción biológicamente activa de cualquiera de las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o receptores de VEGF solubles o receptores de PDGF de la invención. Los fragmentos proporcionados en este documento se definen como secuencias de al menos 6 ácidos nucleicos (contiguos) o al menos 4 aminoácidos (contiguos), una longitud suficiente para permitir la hibridación específica en el caso de ácidos nucleicos o para el reconocimiento específico de un epítipo en el caso de aminoácidos, respectivamente, y son a lo sumo una parte menos de una secuencia de longitud completa. Los fragmentos pueden ser derivados de cualquier porción contigua de una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos de elección. Los derivados son secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos formadas a partir de los compuestos nativos ya sea directamente o por modificación o sustitución parcial. Los análogos son secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos que tienen una estructura similar a, pero no idéntica, el compuesto nativo pero difieren de éste con respecto a ciertos componentes o cadenas laterales. Los análogos pueden ser sintéticos o de un origen evolutivo diferente y pueden tener una actividad metabólica similar u opuesta en comparación con el tipo salvaje. Los homólogos son secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos de un gen particular que se derivan de diferentes especies.

Los derivados y análogos pueden ser de longitud completa o no ser de longitud completa, si el derivado o análogo contiene un ácido nucleico o aminoácido modificado. Los derivados o análogos de los ácidos nucleicos o proteínas incluyen, pero no se limitan a, moléculas que comprenden regiones que son sustancialmente homólogas a los ácidos nucleicos o proteínas en al menos aproximadamente 30%, 50%, 70%, 80%, o 95% de identidad (con una identidad preferida de 50-95%) respecto a una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos de tamaño idéntico o cuando se compara con una secuencia alineada en la que la alineación se hace por un programa de homología de ordenador conocido en la técnica, o cuyo ácido nucleico que codifica es capaz de hibridar con el complemento de una secuencia que codifica las proteínas mencionadas anteriormente en condiciones rigurosas, moderadamente rigurosas, o poco rigurosas. Véase, por ejemplo Ausubel, et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, Nueva York, 1993, y más abajo.

También se describen moléculas de ácido nucleico que difieren de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, o 31 debido a la degeneración del código genético y, por tanto, que codifican las mismas estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o proteínas VEGFR o PDGFR solubles como las codificadas por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, o 31.

Una molécula de ácido nucleico aislada tiene al menos 6 nucleótidos de longitud y se hibrida en condiciones rigurosas con la molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, ó 31. El ácido nucleico tiene al menos 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 1500, 2000, o más nucleótidos de longitud. Una molécula de ácido nucleico aislada se hibrida con la región de codificación, por ejemplo SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, o 31.

Tal como se utiliza en este documento, la expresión "se hibrida bajo condiciones rigurosas" pretende describir condiciones para la hibridación y el lavado en las cuales las secuencias de nucleótidos al menos 60% homólogas entre sí se mantienen típicamente hibridadas entre sí. Además, como se usa en este documento, la frase "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a condiciones en las que una sonda, un cebador o un oligonucleótido se hibridarán con su secuencia diana, pero no con otras secuencias. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas que las secuencias más cortas. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para ser aproximadamente 5°C más bajas que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidos) a la que el 50% de las sondas complementarias a la secuencia diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio. Dado que las secuencias diana están presentes generalmente en exceso, a la T_m, el 50% de las sondas están ocupadas en el equilibrio. Típicamente, las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal será menor que aproximadamente 1,0 M de ión sodio, típicamente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de ión de sodio (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30°C para sondas cortas, cebadores u oligonucleótidos (por ejemplo, de 10 nt a 50 nt) y de al menos aproximadamente

60°C para sondas más largas, cebadores y oligonucleótidos. Las condiciones rigurosas también se pueden lograr con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida.

Las condiciones rigurosas son conocidas por los expertos en la técnica y se pueden encontrar en Ausubel et al, (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Preferiblemente, las condiciones son tales que las secuencias al menos aproximadamente 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% homólogas entre sí permanecen típicamente hibridadas entre sí. Un ejemplo no limitante de condiciones de hibridación rigurosas es la hibridación en un tampón de alto contenido de sal que comprende 6X SSC, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, 0,02% de PVP, 0,02% de Ficoll, 0,02% de BSA, y 500 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 65°C, seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC, 0,01% de BSA a 50°C. Un ejemplo no limitante de condiciones de hibridación de rigurosidad moderada es la hibridación en 6X SSC, 5X solución de Denhardt, 0,5% de SDS y 100 mg de ADN de esperma de salmón desnaturalizado/ml a 55°C, seguido de uno o más lavados en 1X SSC, 0,1% SDS a 37°C. Otras condiciones de rigurosidad moderada que pueden usarse son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Ausubel et al. (eds.), 1993, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, y Kriegler, 1990, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, Nueva York. Un ejemplo no limitante de condiciones de hibridación de rigurosidad baja es la hibridación en 35% de formamida, 5X SSC, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, 0,02% de PVP, 0,02% de Ficoll, 0,2% de BSA, 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, 10% (peso/volumen) de sulfato de dextrano a 40°C, seguido de uno o más lavados en 2X SSC, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM, y 0,1% de SDS a 50°C. Otras condiciones de baja rigurosidad que pueden usarse son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, tal como se emplea para hibridaciones de especies cruzadas). Véase, por ejemplo, Ausubel et al. (eds.), 1993, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, y Kriegler, 1990, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, Nueva York; Shilo y Weinberg, 1981, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 78: 6.789-6.792.

También se proporcionan polipéptidos codificados por cualquiera de las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento. Por ejemplo, estos polipéptidos pueden ser estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas y/o receptores de VEGF solubles o receptores de PDGF. Las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas y/o los receptores de VEGF solubles o receptores de PDGF descritos en este documento se unen (por ejemplo, preferentemente) a VEGF. La unión de estas estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas y/o receptores de VEGF solubles a VEGF, o en combinación con receptores de PDGF a PDGF inhibe la proliferación de células endoteliales y la permeabilidad vascular.

También se describe un polipéptido aislado que es al menos 80% idéntico a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 ó 32. Alternativamente, el polipéptido aislado es al menos 80% homólogo a un fragmento (es decir, al menos 6 aminoácidos contiguos) de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 ó 32.

También se describen polipéptidos aislados que son al menos 80% homólogos a un derivado, análogo u homólogo de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 ó 32.

También se describe un polipéptido aislado que es al menos 80% idéntico a una variante alélica de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 ó 32. Los expertos en la técnica reconocerán que tales polipéptidos deben ser codificados por una molécula de ácido nucleico capaz de hibridarse con una molécula de ácido nucleico de SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, ó 31 en condiciones restrictivas.

Tal como se utiliza en este documento, los términos "proteína" y "polipéptido" se pretende que sean intercambiables. Los nuevos polipéptidos incluyen las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas y polipéptidos del receptor de VEGF soluble o del receptor de PDGF cuya secuencia se proporciona en SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 ó 32. También se describen polipéptidos de mutante o variante, cualquiera de cuyos residuos puede ser cambiado a partir del residuo correspondiente que se muestra en SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, o 32, mientras que aún codifique un polipéptido que mantenga sus actividades de estructura de anticuerpos anti-angiogénica y/o receptor de VEGF soluble o receptor de PDGF y las funciones fisiológicas, o un fragmento(s) funcional de los mismos. En la proteína mutante o variante, hasta el 20% o más de los residuos pueden ser así cambiados.

En general, una variante de la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o un receptor de VEGF soluble o receptor de PDGF que preserva la función anti-angiogénica o tipo VEGFR soluble o tipo PDGFR incluye cualquier variante en la que los residuos en una posición particular en la secuencia han sido sustituidos por otros aminoácidos, e incluye además la posibilidad de insertar un residuo o varios residuos adicionales entre dos residuos de la proteína original así como la posibilidad de suprimir uno o más residuos de la secuencia original. Cualquier sustitución(s), inserción(es), o eliminación(es) de aminoácidos es abarcada por la invención. En circunstancias favorables, la sustitución es una sustitución conservativa.

- Los expertos en la técnica reconocerán que también se describen estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas aisladas y polipéptidos de VEGFR solubles o PDGFR, y las porciones biológicamente activas de los mismos, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos. Las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas y las construcciones de VEGFR o PDGFR solubles descritas en este documento se pueden aislar de células o fuentes de tejido por un esquema de purificación apropiado usando técnicas de purificación de proteínas convencionales. Las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas y polipéptidos de VEGFR o PDGFR solubles se producen mediante técnicas de ADN recombinante. Como una alternativa a la expresión recombinante, una estructura de anticuerpos anti-angiogénica o una proteína VEGFR soluble o PDGFR o polipéptido se puede sintetizar químicamente usando técnicas de síntesis de péptidos estándar.
- Un polipéptido "aislado" o "purificado" o una porción biológicamente activa del mismo está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes o polipéptidos de la fuente celular o tisular de la que se deriva la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o el polipéptido VEGFR soluble o PDGFR, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o polipéptidos de VEGFR o PDGFR solubles en las que el polipéptido se separa de los componentes celulares de las células desde los que se aísla o se produce recombinantemente. Por ejemplo, la expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de estructura de anticuerpos anti-angiogénicas o polipéptido VEGFR o PDGFR que tiene menos de aproximadamente 30% (en peso seco) de no estructura de anticuerpos anti-angiogénica o no proteína VEGFR o PDGFR (también denominado en este documento "proteína contaminante"), más preferiblemente menos de aproximadamente el 20% de no estructura de anticuerpos anti-angiogénica o no proteína VEGFR o no PDGFR, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 10% de no estructura de anticuerpos anti-angiogénica o no proteína VEGFR o no PDGFR, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 5% de no estructura de anticuerpos anti-angiogénica o no proteína VEGFR o no PDGFR. Cuando la estructura de anticuerpos anti-angiogénicas o el polipéptido VEGFR o PDGFR o una porción biológicamente activa del mismo se produce recombinantemente, también está preferiblemente sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, más preferiblemente menos de aproximadamente 10% y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 5% del volumen de la preparación de proteína.
- Del mismo modo, la expresión "sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos" incluye preparaciones de estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o el polipéptido VEGFR o PDGFR soluble en los que el polipéptido se separa de los precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis del polipéptido. Por ejemplo, la expresión "sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos" incluye preparaciones de estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o el polipéptido VEGFR soluble o PDGFR que tienen menos de aproximadamente 30% (en peso seco) de precursores químicos o no estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o no productos químicos de VEGFR o no PDGFR, más preferiblemente menos de aproximadamente 20% de precursores químicos o no estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o no productos químicos PDGFR o VEGFR o, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 10% de precursores químicos o no estructura de anticuerpos anti-angiogénica o no productos químicos de VEGFR o no PDGFR, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 5% de precursores químicos o no estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o no productos químicos de VEGFR o no PDGFR.
- Las porciones biológicamente activas de una estructura de anticuerpos anti-angiogénica o de una construcción de polipéptido VEGFR o PDGFR soluble incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente homólogas o derivadas de la secuencia de aminoácidos de las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o polipéptidos VEGFR solubles o PDGFR, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, o 32 que incluye menos aminoácidos que las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas de longitud completa o constructos VEGFR o PDGFR solubles descritos en el presente documento, y exhiben al menos una actividad de una estructura de anticuerpos anti-angiogénica o de un polipéptido VEGFR soluble o PDGFR de la invención. Típicamente, las porciones biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o polipéptido VEGFR soluble o PDGFR.
- Para determinar el porcentaje de homología de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para la alineación óptima con una segunda secuencia de amino o ácido nucleico). Los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes se comparan luego. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son homólogas en esa posición (es decir, como se usa en el presente documento la "homología" del aminoácido o del ácido nucleico es equivalente a la "identidad" del aminoácido o del ácido nucleico).
- La homología de la secuencia del ácido nucleico puede determinarse como el grado de identidad entre dos secuencias. La homología puede determinarse usando programas de ordenador conocidos en la técnica, tales como el software GAP proporcionado en el paquete de programas GCG. Véase Needleman y Wunsch 1970 J Mol Biol 48: 443-453. La expresión "identidad de secuencia" se refiere al grado en el que dos secuencias de polinucleótidos o de

polipéptidos son idénticas en una base de residuo por residuo respecto a una región particular de comparación. La expresión "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre esa región de comparación, determinando el número de posiciones en las que la base del ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, U, o I, en el caso de ácidos nucleicos) aparece en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la región de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia. La expresión "identidad sustancial" tal como se utiliza en este documento denota una característica de una secuencia de polinucleótidos, donde el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos 80 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 85 por ciento de identidad y a menudo de 90 a 95 por ciento de identidad de secuencia, más habitualmente al menos una identidad de secuencia del 99 por ciento en comparación con una secuencia de referencia sobre una región de comparación.

También se describen estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o proteínas quiméricas de receptor o de fusión de VEGF soluble o PDGFR. Una estructura de anticuerpos anti-angiogénica o una proteína quimérica o de fusión de VEGFR soluble o PDGFR puede ser producida por técnicas de ADN recombinante estándar. Por ejemplo, fragmentos de ADN que codifican para las diferentes secuencias de polipéptidos se ligan juntas en marco de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo, mediante el empleo de extremos romos o escalonados para la ligación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, relleno de extremos cohesivos cuando sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones indeseables, y ligación enzimática. El gen de fusión puede sintetizarse por técnicas convencionales incluyendo sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de genes puede llevarse a cabo usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que posteriormente pueden hibridarse y reamplificarse para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, Ausubel et al. (Eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 1992). Además, muchos vectores de expresión están comercialmente disponibles, que ya codifican un resto de fusión (por ejemplo, un polipéptido GST).

También se describen vectores que contienen cualquiera de las moléculas de ácido nucleico. Específicamente, vectores, preferiblemente vectores de expresión, que contienen un ácido nucleico que codifica estructuras de anticuerpo anti-angiogénicas o polipéptidos VEGFR solubles o PDGFR de la invención, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos.

Tal como se utiliza en este documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que los segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamíferos) son integrados en el genoma de la célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y de ese modo se replican junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Tales vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están a menudo en la forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada del vector.

Se incluyen otras formas de vectores de expresión, tales como los vectores virales (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus, virus adeno-asociados, y los sistemas de recombinación basados en transposón), que sirven a funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinantes comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula huésped, lo que significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas sobre la base de las células hospedadoras a utilizar para la expresión, que están unidas operativamente a la secuencia de ácido nucleico a expresar. Dentro de un vector de expresión recombinante, "unido operativamente" pretende significar que la secuencia de nucleótidos de interés está ligada a la secuencia(s) reguladora(s) de una manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de traducción/transcripción in vitro o en una célula huésped cuando el vector se introduce en la célula huésped).

La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California. (1990). Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de célula huésped y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos sólo en ciertas células huésped (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido). Se apreciará por los expertos en la técnica que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Los vectores de expresión pueden introducirse en células huésped para producir así proteínas o péptidos, incluyendo proteínas o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos como se describe en el presente documento (por ejemplo, estructuras de

anticuerpos anti-angiogénicas, polipéptidos VEGFR o PDGFR solubles, formas mutantes de estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas, formas mutantes de polipéptidos VEGFR solubles o PDGFR, proteínas de fusión, etc.).

5 Los vectores de expresión recombinantes pueden diseñarse para la expresión de estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o construcciones VEGFR solubles o PDGFR en células procariotas o eucariotas. Otros sistemas de expresión adecuados para células tanto procariotas como eucariotas son conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, los capítulos 16 y 17 de Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

10 Además, se describen células huésped o líneas celulares que contienen tales vectores (o cualquiera de las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento). Tal como se utiliza en este documento, las expresiones "célula huésped" y "célula huésped recombinante" se usan indistintamente en el presente documento. Se entiende que tales términos se refieren no sólo a la célula objeto particular sino a la progenie o progenie potencial de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutaciones o a influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero
15 todavía estar incluida dentro del alcance del término tal como se usa en el presente documento.

Una célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. A modo de ejemplo no limitativo, la célula huésped puede ser una célula ARPE-19. Sin embargo, otras células huésped adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica.

20 El ADN del vector puede introducirse en células procariotas o eucariotas mediante técnicas de transformación o transfección convencionales. Tal como se utiliza en este documento, los términos "transformación" y "transfección" pretenden referirse a una variedad de técnicas reconocidas en la técnica para introducir ácido nucleico ajeno (por ejemplo, ADN) en una célula huésped, incluyendo fosfato de calcio o co-precipitación con cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, o electroporación. Los métodos adecuados para transformar o transfectar células huésped pueden encontrarse en Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª
25 ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), y otros manuales de laboratorio.

Para la transfección estable de células de mamífero, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y de la técnica de transfección utilizada, sólo una pequeña fracción de células puede integrar el ADN ajeno en su genoma. Con el fin de identificar y seleccionar estos integrantes, un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, con resistencia a antibióticos) se introduce generalmente en las células huésped junto con el gen de interés. Diversos marcadores seleccionables incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina, metotrexato, y/o blastidina.

30 El ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable puede introducirse en una célula huésped en el mismo vector que codifica el constructo de receptor de la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o VEGF soluble o PDGF o se puede introducir en un vector separado. Las células transfectadas de forma estable con el ácido nucleico introducido pueden identificarse por selección de fármacos (por ejemplo, las células que han incorporado el gen del marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán).

Una célula huésped, tal como una célula huésped procariota o eucariota en cultivo, puede utilizarse para producir (es decir, expresar) cualquiera de las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o construcciones de polipéptido
40 soluble de VEGFR o PDGFR descritas en este documento.

Por consiguiente, también se describen métodos para producir estas estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o polipéptidos VEGFR o PDGFR solubles utilizando las células huésped de la invención. El método comprende cultivar la célula huésped (en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o VEGFR soluble o PDGFR) en un medio adecuado, tal que se produce la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o el polipéptido soluble VEGFR o PDGFR. El método comprende además aislar la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o VEGFR soluble o PDGFR del medio o de la célula huésped.

La invención proporciona líneas celulares de células ARPE-19 modificadas por ingeniería genética para producir una cantidad terapéutica de una estructura de anticuerpos anti-angiogénica o un receptor de VEGF soluble o receptor de PDGF, en el que la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o el receptor de VEGF soluble o el receptor de PDGF es codificado por una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 31. Del mismo modo, la invención también proporciona líneas celulares de células ARPE-19 modificadas por ingeniería genética para producir una estructura de anticuerpos anti-angiogénica o un receptor VEGF soluble o PDGF que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 32.

Preferiblemente, la cantidad terapéutica es de al menos 1 pg a 1000 µg/día/dispositivo de 6 mm. Los expertos en la técnica reconocerán que la cantidad terapéutica puede ser cualquier cantidad que caiga dentro de este rango (inclusive). Por otra parte, las líneas celulares y los dispositivos de la presente invención son capaces de expresar esta cantidad terapéutica durante un período de al menos tres semanas. En algunas realizaciones, la cantidad terapéutica es al menos 100-10.000 ng/día. En una realización no limitante, la cantidad es de al menos 4 µg/día.

También se describen en este documento dispositivos de cultivo de células implantables que contienen una o más de las líneas celulares de la invención (es decir, células ARPE-19 que se han diseñado genéticamente para producir una cantidad terapéutica de cualquiera de las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas y/o los receptores de VEGF solubles o el receptor de PDGFR descrito en este documento) y una membrana semipermeable que rodea el núcleo, en el que la membrana permite la difusión de la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o el receptor de VEGF soluble o el receptor PDGF a su través. Los términos "cápsula" y "dispositivo" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a cualquier órgano bioartificial que contiene células manipuladas genéticamente y líneas celulares (por ejemplo, células ARPE-19 o líneas celulares).

En algunas realizaciones, el núcleo contiene, además, una matriz dispuesta dentro de la membrana semipermeable. A modo de ejemplo no limitativo, la matriz puede incluir un hidrogel o componentes de la matriz extracelular. Por ejemplo, el hidrogel puede contener alginato reticulado con un ion multivalente. En otras realizaciones, la matriz incluye una pluralidad de monofilamentos, en la que los monofilamentos están retorcidos en un hilo o tejido en una malla o se retuercen en un hilo que está en hebras no tejidas, y en el que las células o tejidos se distribuyen sobre la misma. Los expertos en la técnica reconocerán que la matriz que da soporte a las células filamentosas puede estar hecha de un material biocompatible seleccionado del grupo que consiste en acrílico, poliéster, polietileno, polipropileno poliacetonitrilo, tereftalato de polietileno, nilón, poliamidas, poliuretanos, polibutiléster, seda, algodón, quitina, carbono, y/o metales biocompatibles. Como se usa en este documento, una "estructura interna" es un ejemplo no limitativo de una "matriz" adecuada para su uso en cualquiera de los dispositivos de la invención.

En algunas realizaciones, los dispositivos de encapsulación de células descritos en este documento tienen también un anclaje de fijación. Por ejemplo, el anclaje de fijación puede ser un bucle de anclaje que esté adaptado para el anclaje de la cápsula a una estructura ocular. Cualquiera de los dispositivos descritos en el presente documento son adecuados para su implantación en el ojo u otra región diana del cuerpo seleccionado de entre bazo, oído, corazón, colon, hígado, riñón, mama, articulaciones, médula ósea, y los espacios subcutáneos y peritoneal. A modo de ejemplo no limitativo, las cápsulas se pueden implantar en el cuerpo vítreo, el humor acuoso, el espacio de la subtenoniana, el espacio periocular, la cámara posterior, y/o la cámara anterior del ojo.

Las camisas de los dispositivos descritos en este documento preferiblemente están hechas de una membrana de permeabilidad selectiva inmunoaislante. Por ejemplo, las chaquetas están hechas de una membrana de ultrafiltración o una membrana de microfiltración. Los expertos en la técnica reconocerán que una membrana de ultrafiltración tiene típicamente un tamaño de poro de 1 a 100 nm, mientras que una membrana de microfiltración tiene típicamente un tamaño de poro de 0,1 a 10 µm. En otras realizaciones, la camisa puede estar hecha de un material de membrana no porosa (por ejemplo, un hidrogel o un poliuretano). Los términos "camisa" y "membrana semipermeable" se usan indistintamente en el presente documento.

En cualquiera de los dispositivos descritos en este documento, la cápsula se puede configurar como una fibra hueca o una lámina plana. Además, en varias realizaciones, al menos una molécula biológicamente activa adicional se puede co-liberar a partir de estos dispositivos. Por ejemplo, la al menos una molécula biológicamente activa adicional puede ser de una fuente no celular o una celular (es decir, la al menos una molécula biológicamente activa adicional es producida por o diseñada genéticamente por una o más células ARPE-1 en el núcleo).

También se describen en este documento métodos para el tratamiento de trastornos oftálmicos mediante la implantación de los dispositivos de cultivo celular implantable de la invención en el ojo de un paciente y permitiendo que la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o el receptor de VEGF soluble o el receptor de PDGF se difunda desde el dispositivo y se una a VEGF y/o PDGF en el ojo, tratando de este modo el trastorno oftálmico. Por ejemplo, el trastorno oftálmico a tratar puede ser seleccionado del grupo que consiste en retinopatía de la prematuridad, edema macular diabético, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma, retinitis pigmentosa, formación de cataratas, retinoblastoma e isquemia retinal. En una realización preferida, la degeneración macular relacionada con la edad es la forma húmeda de la degeneración macular relacionada con la edad. En otra realización preferida, el trastorno oftálmico es la retinopatía diabética.

Además se describen métodos para inhibir la proliferación de células endoteliales mediante la implantación de los dispositivos de cultivo de células implantables de la invención en un paciente que sufre de un trastorno de proliferación celular y permitiendo que la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o el receptor de VEGF soluble o el receptor de PDGF se difunda desde el dispositivo y se una a VEGF o PDGF, en el que la unión inhibe la proliferación endotelial de las células en el paciente. Por ejemplo, el trastorno se selecciona del grupo que consiste en trastornos hematológicos, aterosclerosis, inflamación, aumento de la permeabilidad vascular y malignidad.

También se describen métodos de administración de una estructura de anticuerpos anti-angiogénica o un receptor de VEGF soluble o receptor de PDGF a un huésped receptor implantando el dispositivo de cultivo celular implantable

descrito en la presente memoria en una región diana del huésped receptor, en el que la una o más células ARPE-19 encapsuladas secretan la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o el receptor de VEGF soluble o receptor de PDGF en la región diana. Las regiones diana preferidas incluyen el sistema nervioso central, incluyendo el cerebro, el ventrículo, la médula espinal o los humores acuoso y vítreo del ojo. Otras regiones diana pueden incluir, pero no se limitan a, todo el cuerpo para la administración sistémica y/o sitios diana localizados dentro o cerca de órganos del cuerpo como la mama, el colon, el bazo, los ovarios, los testículos, y/o la médula ósea.

Los expertos en la técnica reconocerán que en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento con respecto a la implantación y/o a los trastornos oculares, pueden difundirse entre 0,1 pg y 1000 µg por paciente por día de la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o receptores de VEGF solubles o receptor PDGF de la invención desde los dispositivos de cultivo de células implantables. Sin embargo, para la implantación sistémica en otras regiones diana del cuerpo, la cantidad terapéuticamente eficaz podría ser más de 1000 mg por paciente por día. Para tales indicaciones sistémicas, los expertos en la técnica reconocerán que tendrían que ser empleados dispositivos de ECT mucho más grandes.

Preferiblemente, para la implantación ocular, la cantidad terapéutica es cualquier cantidad entre 1 pg y 1000 µg/día/6 mm de dispositivo (inclusive). En algunas realizaciones, la cantidad terapéutica es al menos 1000 ng/día (1,0 pcd). Por otra parte, las líneas celulares y los dispositivos de la presente invención son capaces de expresar esta cantidad terapéutica durante un período de al menos tres semanas.

Además, la invención también proporciona métodos para la fabricación de dispositivos de cultivo de células implantables de la invención. En un método, al menos una célula ARPE-19 se manipula genéticamente para secretar una estructura de anticuerpos anti-angiogénica o un receptor de VEGF soluble o receptor de PDGF codificado por una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 31 y las células ARPE-19 modificadas genéticamente se encapsulan dentro de una membrana semipermeable, en el que dicha membrana permite la difusión de la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o el receptor de VEGF soluble o el receptor PDGF a su través. En otro método, al menos una célula ARPE-19 es manipulada por ingeniería genética para secretar una estructura de anticuerpos anti-angiogénica o un receptor de VEGF soluble o receptor PDGF que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 32, y las células ARPE-19 modificadas genéticamente se encapsulan dentro de una membrana semipermeable, en la que dicha membrana permite la difusión de la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o el receptor de VEGF soluble o el receptor PDGF a su través.

La invención también describe el uso de una o más células ARPE-19 que se han diseñado genéticamente para producir cualquiera de los polipéptidos de la invención (por ejemplo, SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, o 32) en la fabricación de cualquiera de los dispositivos de cultivo de células implantables de acuerdo con la invención para el tratamiento de trastornos vasculares, incluyendo los del ojo, por ejemplo, mediante la implantación del dispositivo en el ojo del paciente, o en otro sitio enfermo para la entrega del factor anti-angiogénico localizado y específico.

Por otra parte, cualquiera de los dispositivos de cultivo de células implantables descritos en este documento se pueden utilizar para el tratamiento de trastornos oftálmicos por la implantación del dispositivo en el ojo de un paciente y permitiendo que las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o los receptores de VEGF solubles o receptores de PDGF de la invención se difundan desde el dispositivo y se unan a VEGF y/o PDGF en el ojo.

También se proporcionan una o más células ARPE-1 que se han diseñado genéticamente para producir cualquiera de los polipéptidos de la invención para el tratamiento de trastornos oftálmicos mediante la implantación de cualquiera de los dispositivos de cultivo celular implantable de la invención en el ojo de un paciente y permitiendo que la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o el receptor de VEGF soluble o el receptor de PDGF se difundan desde el dispositivo y se unan a VEGF o PDGF en el ojo.

Cualquiera de las moléculas de ácido nucleico aisladas descritas en la presente memoria también se puede utilizar en la fabricación de una o más células ARPE-19 que se han diseñado genéticamente para producir uno de los polipéptidos para el tratamiento de trastornos oftálmicos mediante la implantación en el ojo de un paciente de un dispositivo implantable de cultivo celular de la invención y permitiendo que estructura de anticuerpos anti-angiogénica o el receptor de VEGF soluble o el receptor de PDGF se difunda desde el dispositivo y se una a VEGF o PDGF en el ojo. Por otra parte, cualquiera de las moléculas de ácido nucleico aisladas también se pueden utilizar para el tratamiento de trastornos oftálmicos, donde el tratamiento comprende implantar en el ojo de un paciente un dispositivo de cultivo celular implantable de acuerdo con la presente invención y permitir que la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o el receptor de VEGF soluble o el receptor de PDGF se difunda desde el dispositivo y se una a VEGF y/o PDGF en el ojo, en el que dichas una o más células ARPE-19 en dicho dispositivo se han modificado genéticamente con dicha molécula aislada de ácido nucleico para producir de ese modo cualquiera de los polipéptidos aislados descritos en este documento.

En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el trastorno vascular se selecciona de, pero no está limitado a, por ejemplo, retinopatía de la prematuridad, edema macular diabético, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad (por ejemplo, la forma húmeda de la degeneración macular relacionada con la edad), glaucoma, retinitis pigmentosa, formación de cataratas, retinoblastoma e isquemia retinal.

5 Los expertos en la técnica reconocerán que cualquiera de los dispositivos descritos en este documento también se puede utilizar para tratar una variedad de trastornos vasculares no oculares.

La invención también proporciona el uso de una o más células ARPE-19 que se han diseñado genéticamente para producir un polipéptido de la invención (por ejemplo, una estructura de anticuerpo anti-angiogénica o una molécula anti-angiogénica) en la fabricación de un dispositivo de cultivo de células implantable según la invención para inhibir la proliferación de células endoteliales por la implantación del dispositivo en el ojo de un paciente que sufre de un trastorno de la proliferación celular y permitiendo que la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o el receptor de VEGF soluble o el receptor de PDGF se difunda desde el dispositivo y se una a VEGF y/o PDGF en el ojo para inhibir así la proliferación de células endoteliales en dicho paciente. Del mismo modo, la invención también proporciona dispositivos de cultivo de células implantables de la invención para inhibir la proliferación de células endoteliales por la implantación del dispositivo en el ojo de un paciente que sufre de un trastorno de proliferación celular y permitiendo que la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o el receptor de VEGF soluble o el receptor de PDGF se difunda desde el dispositivo y se una a VEGF y/o PDGF en el ojo y que, por lo tanto, inhiba la proliferación de células endoteliales en dicho paciente.

En otras realizaciones, la invención proporciona una o más células ARPE-1 que se han diseñado genéticamente para producir cualquiera de los polipéptidos de la invención para inhibir la proliferación de células endoteliales mediante la implantación de cualquiera de los dispositivos de cultivo de células implantables descritos en este documento en el ojo de un paciente que sufre de un trastorno de proliferación celular y permitiendo que la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o el receptor de VEGF soluble o el receptor de PDGF se difunda desde el dispositivo y se una a VEGF o PDGF en el ojo y que, por lo tanto, inhiba la proliferación de células endoteliales en dicho paciente.

También se contempla el uso de cualquiera de las moléculas de ácido nucleico aisladas descritas en este documento en la fabricación de una o más células ARPE-19 que se han diseñado genéticamente para producir el polipéptido(s) para inhibir la proliferación de células endoteliales por la implantación en el ojo de un paciente que sufre de un trastorno de proliferación celular de un dispositivo implantable de cultivo celular de acuerdo con la presente invención y permitiendo que la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o el receptor de VEGF soluble o el receptor de PDGF se difunda desde el dispositivo y se una a VEGF o PDGF en el ojo y para, de ese modo, inhibir la proliferación de células endoteliales en dicho paciente.

Por otra parte, la invención proporciona también cualquiera de las moléculas de ácido nucleico aisladas de acuerdo con la invención para inhibir la proliferación de células endoteliales, comprendiendo el tratamiento la implantación en el ojo de un paciente que sufre de un trastorno de proliferación celular de un dispositivo de cultivo celular implantable de acuerdo con la invención y permitiendo que la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o el receptor de VEGF soluble o el receptor de PDGF se difunda desde el dispositivo y se una a VEGF y/o PDGF en el ojo para inhibir así la proliferación de células endoteliales en dicho paciente, y en el que dichas una o más células ARPE-19 en dicho dispositivo han sido diseñados genéticamente con dicha molécula aislada de ácido nucleico para producir de este modo un polipéptido.

Los expertos en la técnica reconocerán que el trastorno de proliferación celular puede ser seleccionado de entre el grupo que consiste en trastornos hematológicos, aterosclerosis, inflamación, aumento de la permeabilidad vascular y malignidad y que puede ser localizado en diversas partes del cuerpo, incluyendo, pero no limitado a, el ojo. El dispositivo ECT, por lo tanto, se puede colocar en la proximidad de las regiones localizadas para tratar el trastorno mencionado.

También se proporciona en el presente documento el uso de una o más células ARPE-19 que se han diseñado genéticamente para producir cualquiera de los polipéptidos descritos en este documento en la fabricación de un dispositivo de cultivo celular implantable de acuerdo de la invención para la entrega de una estructura de anticuerpos anti-angiogénica o una receptor soluble de VEGF o receptor de PDGF a un huésped receptor por la implantación del dispositivo en una región diana del huésped receptor y en el que la una o más células ARPE-1 encapsuladas secretan la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o el receptor de VEGF soluble o el receptor de PDGF en la región diana. Del mismo modo, cualquiera de los dispositivos de cultivo de células implantables de la invención se puede usar para la entrega de una estructura de anticuerpos anti-angiogénica o un receptor de VEGF soluble o receptor de PDGF a un huésped receptor por la implantación del dispositivo en una región diana del huésped receptor y en el que las una o más células ARPE-19 encapsuladas secretan la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o el receptor de VEGF soluble o el receptor de PDGF en la región diana.

Por otra parte, una o más células ARPE-19 que se han diseñado genéticamente para producir cualquiera de los polipéptidos descritos en este documento pueden ser utilizadas para la entrega de una estructura de anticuerpos anti-angiogénica o un receptor de VEGF soluble o receptor de PDGF a un huésped receptor por la implantación de cualesquiera dispositivos de cultivo de células implantables de la invención en una región diana del huésped

receptor y en el que las una o más células ARPE-19 encapsuladas secretan la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o el receptor de VEGF soluble o el receptor de PDGF en la región diana.

5 Del mismo modo, cualquiera de las moléculas de ácido nucleico aisladas descritas en este documento se pueden utilizar en la fabricación de una o más células ARPE-19 que se han diseñado genéticamente para producir cualquiera de los polipéptidos descritos en este documento para la entrega de una estructura de anticuerpos anti-angiogénica o un receptor de VEGF soluble o receptor de PDGF a un huésped receptor por la implantación en una región diana del huésped receptor de un dispositivo de cultivo celular implantable de la invención, en el que las una o más células ARPE-19 encapsuladas secretan la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o el receptor de VEGF soluble o el receptor de PDGF en la región diana.

10 Cualquiera de las moléculas de ácido nucleico aisladas descritas en la presente memoria también se pueden usar para la entrega de una estructura de anticuerpos anti-angiogénica o un receptor de VEGF soluble o un receptor de PDGF a un huésped receptor, comprendiendo dicha entrega implantar en una región diana del huésped receptor un dispositivo de cultivo de células implantable de la invención, en el que las una o más células ARPE-19 encapsuladas secretan la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o el receptor de VEGF soluble o el receptor de PDGF en la
15 región diana, y en el que dichas una o más células ARPE-19 en dicho dispositivo han sido diseñadas genéticamente con dicha molécula aislada de ácido nucleico para producir de este modo cualquiera de los polipéptidos de la invención.

Los expertos en la técnica reconocerán que la región diana se selecciona entre el sistema nervioso central, incluyendo el cerebro, ventrículo, médula espinal, y los humores acuoso y vítreo del ojo. Otras regiones diana
20 pueden estar situadas en cualquier parte del cuerpo, y los dispositivos de ECT pueden ser colocados en la proximidad de esas regiones. Las regiones pueden incluir, pero no se limitan a, bazo, oído, corazón, colon, hígado, riñón, mama, articulaciones, médula ósea, espacios subcutáneos y peritoneales.

También se describen métodos para producir un polipéptido aislado, comprendiendo el método expresar cualquiera de las moléculas de ácido nucleico aisladas que se describen en este documento y recuperar el polipéptido
25 expresado.

La presente invención también proporciona líneas celulares que comprenden una célula ARPE-19 modificada por ingeniería genética para producir una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas (por ejemplo, al menos 10.000 ng/día/10⁶ células). Preferiblemente, las líneas celulares producen la cantidad terapéuticamente eficaz durante un periodo de al menos 3 meses (es decir,
30 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, o más meses).

En algunas realizaciones no limitantes, las una o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas se pueden introducir en la célula ARPE-19 utilizando un proceso de transfección iterativo. Específicamente, la transfección iterativa puede ser una transfección, dos transfecciones, tres transfecciones, o más transfecciones (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más transfecciones). Cuando el proceso de transfección iterativo sea de una transfección, la línea celular contendrá una estructura de anticuerpo anti-angiogénica o molécula anti-angiogénica. Cuando el proceso de transfección iterativo sea de dos transfecciones, la línea celular contendrá dos estructuras de anticuerpos anti-angiogénicos o moléculas anti-angiogénicos. Estas pueden ser las mismas o diferentes estructuras de anticuerpos anti-angiogénicos o moléculas anti-angiogénicos. Cuando el proceso de transfección iterativo sea de tres transfecciones, la línea celular contendrá tres estructuras de anticuerpos anti-angiogénicos o moléculas anti-angiogénicos. Estas pueden ser las mismas o diferentes estructuras de anticuerpos anti-angiogénicos o moléculas anti-angiogénicos. Los expertos en la técnica reconocerán que el número de transfecciones en el proceso de transfección iterativo determinará el número de estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas (iguales o diferentes) y/o moléculas anti-angiogénicos en la línea celular resultante.
35
40

En algunas realizaciones, la línea celular produce entre 10.000 y 30.000 ng/día/10⁶ células de las una o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénica o moléculas anti-angiogénicas, cuando la transfección iterativa consiste en una transfección. Preferiblemente, la línea celular produce aproximadamente o al menos 15.000 ng/día/10⁶ células de las una o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas. En otras realizaciones, la línea celular produce entre 30.000 y 50.000 ng/día/10⁶ células de las una o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas, cuando la transfección iterativa consiste en dos transfecciones. Preferiblemente, la línea celular produce aproximadamente o al menos 35.000 ng/día/10⁶ células de las una o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas. En todavía otras realizaciones, la línea celular produce entre 50.000 y 75.000 ng/día/10⁶ células de las una o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas, cuando la transfección iterativa consiste en tres transfecciones. Preferiblemente, la línea celular produce aproximadamente o al menos 70.000 ng/día/10⁶ células de las una o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas.
45
50
55

Las moléculas anti-angiogénicos pueden ser, por ejemplo, un receptor de VEGF soluble y/o un receptor de PDGF soluble.

El proceso de transfección iterativo se puede utilizar para introducir múltiples copias de la misma estructura(s) de anticuerpos anti-angiogénica y/o molécula anti-angiogénica(s) en las células ARPE-19. Alternativamente, el proceso de transfección iterativo también se puede utilizar para introducir múltiples copias de diferentes estructura(s) de anticuerpos anti-angiogénica y/o molécula(s) anti-angiogénicas en las células ARPE-19.

- 5 En una realización, la célula ARPE-19 se manipula genéticamente mediante un vector que comprende un receptor de VEGF soluble codificado por una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO. 1 o un receptor de VEGF soluble que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 2.

La invención proporciona, además, las líneas celulares que comprenden una célula ARPE-1 modificada por ingeniería genética para producir una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas, en las que la cantidad terapéuticamente eficaz es al menos 10.000 ng/día/10⁶ células (por ejemplo, al menos, 15.000, 20.000, 25.000, 30.000, 35.000, 40.000, 5.000, 50.000, 55.000, 60.000, 65.000, 70.000, 75.000, o más ng/día/10⁶ células. Tales líneas celulares son capaces de producir esta cantidad terapéuticamente eficaz durante al menos 3 meses (por ejemplo, al menos 6, 9, 12, 15, 18, 21, o 24 meses) o más. Los expertos en la técnica reconocerán que, tales líneas celulares pueden, en algunas realizaciones, ser producidas usando un proceso iterativo de transfección, tal como se describe en el presente documento. Sin embargo, otros métodos conocidos en la técnica también se pueden utilizar para obtener la producción de la cantidad terapéuticamente eficaz de las una o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas.

20 Cualquiera de las líneas celulares descritas en este documento pueden ser diseñadas genéticamente para secretar una estructura de anticuerpo anti-angiogénica o un receptor de VEGF soluble o receptor de PDGF codificado por una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 31. Del mismo modo, cualquiera de las líneas celulares descritas en este documento pueden manipularse genéticamente para secretar una estructura de anticuerpos anti-angiogénica o un receptor de VEGF soluble o receptor PDGF que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 32.

30 También se describen en este documento dispositivos de cultivo de células implantables que contienen un núcleo que contiene una o más de las líneas celulares de la invención (es decir, las células ARPE-1 que se han diseñado genéticamente usando un proceso iterativo de transfección para producir una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas y/o las moléculas anti-angiogénicas descritas en este documento o células ARPE-19 modificadas por ingeniería genética para secretar al menos 10.000 ng/día/10⁶ células) y una membrana semipermeable que rodea el núcleo, en el que la membrana permite la difusión de las una o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas y/o moléculas anti-angiogénicas a su través.

En algunas realizaciones, el núcleo contiene 0,5-1,0 x 10⁶ células.

40 El núcleo puede contener adicionalmente una matriz dispuesta dentro de la membrana semipermeable. En otras realizaciones, la matriz incluye una pluralidad de monofilamentos, en la que los monofilamentos están retorcidos en un hilo o tejido en un acoplamiento o se retuercen en un hilo que está en hebras no tejidas, y en el que las células o tejidos se distribuyen sobre el mismo. Los expertos en la técnica reconocerán que los monofilamentos se pueden hacer de un material biocompatible seleccionado de acrílico, poliéster, polietileno, poliacetónitrilo polipropileno, tereftalato de polietileno, nilón, poliamidas, poliuretanos, polibutiléster, seda, algodón, quitina, carbono, y/o metales biocompatibles. Por ejemplo, los monofilamentos son fibras de tereftalato de polietileno (PET) que comprenden entre 40 y 85% del volumen interno del dispositivo.

45 Los dispositivos de encapsulación de células descritos en este documento también pueden tener un anclaje de fijación. Por ejemplo, el anclaje de fijación puede ser un bucle de anclaje que esté adaptado para anclar el dispositivo a una estructura ocular.

50 Cualquiera de los dispositivos descritos en el presente documento se pueden implantar (o son para la implantación) en el ojo u otra región diana del cuerpo, tal como, por ejemplo, bazo, oído, corazón, colon, hígado, riñón, mama, articulaciones, médula ósea, espacios subcutáneos y/o peritoneales. A modo de ejemplo no limitativo, los dispositivos se pueden implantar (o son para la implantación) en el vítreo, el humor acuoso, el espacio de la subtenoniana, el espacio periorcular, la cámara posterior, y/o la cámara anterior del ojo.

55 La membrana semi-permeable de los dispositivos descritos en este documento preferiblemente está hecha de una membrana de permeabilidad selectiva e inmunoprotectora. En otras realizaciones, la membrana semipermeable está hecha de una membrana de ultrafiltración o de una membrana de microfiltración. Los expertos en la técnica reconocerán que una membrana semi-permeable tiene típicamente un tamaño medio de poro de aproximadamente 100 nm.

En todavía otras realizaciones, la membrana semi-permeable puede estar hecha de un material de membrana no poroso (por ejemplo, un hidrogel o un poliuretano). En cualquiera de los dispositivos descritos en este documento, el punto de corte nominal del peso molecular (MWCO) de la membrana semi-permeable es de 500 kD. Preferiblemente, la membrana semi-permeable está entre aproximadamente 90 y 120 μm de espesor. Cualquiera de los dispositivos descritos en el presente documento se puede configurar como una fibra hueca o una lámina plana. La longitud del dispositivo puede estar entre aproximadamente 4 mm - 11 mm. En algunas realizaciones, el dispositivo tiene un diámetro interno de entre aproximadamente 0,9 mm - 1,2 mm. En una realización preferida, los extremos del dispositivo se sellan utilizando metacrilato de metilo.

Cualquier dispositivo de la presente invención puede incluir uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o todas las siguientes características adicionales:

- a. el núcleo contiene entre $0,5-1,0 \times 10^6$ células ARPE-19;
- b. la longitud del dispositivo está entre 4 mm y 11 mm;
- c. el diámetro interno del dispositivo está entre 0,9 y 1,2 mm;
- d. los extremos del dispositivo se sellan utilizando metacrilato de metilo;
- e. la membrana semi-permeable tiene un tamaño medio de poro de aproximadamente 100 nm;
- f. el punto de corte del peso molecular nominal (MWCO) de la membrana semi-permeable es de 500 kD;
- g. la membrana semipermeable está entre 90-120 μm de espesor;
- h. el núcleo comprende una estructura interna, en el que la estructura comprende fibras de tereftalato de polietileno (PET) que comprenden entre 40-85% del volumen interno del dispositivo; y
- i. cualquier combinación o combinaciones de los mismos.

Además, en varias realizaciones, al menos una molécula biológicamente activa adicional se puede co-liberar de estos dispositivos. Por ejemplo, la al menos una molécula biológicamente activa adicional puede provenir de una fuente no celular o una celular (es decir, la al menos una molécula biológicamente activa adicional se produce por una o más células ARPE-19 modificadas por ingeniería genética en el núcleo).

Además se describen usos de cualquiera de los dispositivos de cultivo de células implantables de la invención para suministrar una dosis terapéutica apropiada de las una o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas a un ojo de un sujeto, en el que la dosis terapéutica es al menos 100 ng/día/ojo (por ejemplo, al menos 100, 200, 300, 400, 500, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, o más ng/día/ojo). Del mismo modo, la invención también proporciona una o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas para uso en el tratamiento de un sujeto en necesidad del mismo mediante la entrega de una dosis terapéutica apropiada de las una o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas a un ojo del sujeto, en el que la dosis terapéutica es al menos 100 ng/día/ojo (por ejemplo, al menos 100, 200, 300, 400, 500, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, o más ng/día/ojo).

También se describen en este documento métodos para el tratamiento de trastornos oftálmicos mediante la implantación de cualquiera de los dispositivos de cultivo celular implantable de la invención en el ojo de un paciente y permitiendo que las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas se difundan desde el dispositivo y se unan a VEGF y/o PDGF en el ojo, tratando de este modo el trastorno oftálmico. En algunas realizaciones, la invención proporciona líneas celulares (es decir, cualquiera de las líneas celulares descritas en la presente memoria) para su uso en el tratamiento de trastornos oftálmicos, en el que las líneas celulares se incorporan en un dispositivo de cultivo celular implantable, en el que los dispositivos se implantan en el ojo de una paciente, y en el que las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas se difunden desde el dispositivo y se unen a VEGF y/o PDGF en el ojo, tratando de este modo el trastorno oftálmico.

Por ejemplo, el trastorno oftálmico a tratar se puede seleccionar de retinopatía del prematuro, edema macular diabético, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma, retinitis pigmentosa, formación de cataratas, retinoblastoma e isquemia retinal. En una realización preferida, la degeneración macular relacionada con la edad es la forma húmeda de la degeneración macular relacionada con la edad. En una realización preferida, el trastorno oftálmico es la retinopatía diabética.

Además se describen métodos para inhibir la proliferación de células endoteliales o la vascularización mediante la implantación de los dispositivos de cultivo de células implantables de la invención en un paciente que sufre de un trastorno de proliferación celular y permitiendo que la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o la molécula de anti-angiogénica se difunda desde el dispositivo y se una a VEGF y/o PDGF, en el que la unión inhibe la proliferación de células endoteliales o la vascularización en el paciente. Por ejemplo, el trastorno puede ser seleccionado de trastornos hematológicos, aterosclerosis, inflamación, aumento de la permeabilidad vascular y

malignidad. En tales métodos, la cantidad terapéuticamente eficaz por paciente por día de la estructura(s) de anticuerpos anti-angiogénica o la molécula(s) anti-angiogénica se difunde desde el dispositivo.

5 También se describen métodos de administración de una estructura de anticuerpos anti-angiogénica o una molécula anti-angiogénica a un huésped receptor mediante la implantación de cualquiera de los dispositivos de cultivo de células implantables descritos en este documento en una región diana del huésped receptor, en el que las una o más células ARPE -19 encapsuladas secretan la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o la molécula anti-angiogénica en la región diana. Las regiones diana preferidas pueden incluir, pero no se limitan a, el sistema nervioso central, incluyendo el cerebro, ventrículo, la médula espinal, los humores acuoso y vítreo del ojo, el bazo, el oído, corazón, colon, hígado, riñón, mama, articulaciones, médula ósea, espacios subcutáneos y/o peritoneales. 10 Otras regiones diana pueden incluir, pero no se limitan a, todo el cuerpo para la administración sistémica y/o sitios diana localizados dentro o cerca de los órganos del cuerpo como el de mama, colon, bazo, ovario, testículo, y/o médula ósea. En tales métodos, la cantidad terapéuticamente eficaz por paciente por día de la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o la molécula anti-angiogénica se difunde en la región diana.

15 Los expertos en la técnica reconocerán que en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento con respecto a la implantación y/o los trastornos oculares, una cantidad terapéuticamente eficaz por paciente por día de la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o la molécula anti-angiogénica de la invención se difunde desde los dispositivos de cultivo de células implantables. Por ejemplo, entre 0,1 pg y 1000 µg por paciente por día de la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o la molécula anti-angiogénica pueden difundirse desde los dispositivos de cultivo de células implantables (por ejemplo, en la región o regiones diana).

20 La invención también proporciona métodos para la fabricación de los dispositivos de cultivo de células implantables de la invención. Por ejemplo, por ingeniería genética al menos una célula ARPE-19 que secreta una o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas (por ejemplo, las codificadas por una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 , SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: L5, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, 25 SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 31), y encapsulando las células ARPE-19 modificadas genéticamente dentro de una membrana semipermeable, en el que dicha membrana permite la difusión de la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o la molécula anti-angiogénica a su través. En un ejemplo preferido, la molécula anti-angiogénica de la presente invención es un receptor de VEGF soluble y/o un receptor de PDGF soluble.

30 A menos que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por cualquier experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados.

35 En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones, prevalecerá. Además, los materiales, métodos, y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

40 La Figura 1 es un esquema que muestra el mapa del vector de expresión pCpGfree-vitro (InvivoGen).

La figura 2 muestra un ejemplo de detección de la línea celular y la determinación por golpeado con células que expresan la molécula p834.

La Figura 3 muestra los resultados del Western Blot de las moléculas p834 y p873 y los resultados de SDS-PAGE de la molécula p834.

45 La Figura 4 muestra los bioensayos HUVEC de p834 y p838.

La Figura 5 muestra el ensayo de unión en solución de p834.

La Figura 6 muestra la estabilidad de la línea celular que expresa p834.

Figura 7 muestra las secciones histológicas del dispositivo p834 ECT después de 4 semanas mantenido en un recipiente.

50 La Figura 8 muestra la histología del dispositivo p834 ECT explantado después de tres meses de la implantación en ojos de conejo blanco de Nueva Zelanda.

La Figura 9 muestra el PCD de líneas de células productoras de proteínas 834, en una gráfica de masa en relación con la potencia. Se representan la primera, segunda y tercera transfección/iteración de las líneas celulares.

La figura 10 muestra la detección por ELISA de las proteínas de fusión PDGFR beta Fc como se produce por células transfectadas por p963 y p964.

La figura 11 muestra un ejemplo de líneas celulares clonales que producen PDGFR-D1-D5-hIgG1 Fc.

5 La figura 12 muestra las líneas celulares representativas que secretan moléculas anti-angiogénicas, incluyendo el anticuerpo monoclonal, el fragmento Fab, anticuerpos de cadena sencilla, y el receptor Fc.

La figura 13 muestra la producción de proteínas del dispositivo de líneas celulares representativas Mab, ScFv, Fab, y el receptor Fc en formato ECT in vitro.

La Figura 14 es un esquema que muestra las estructuras relativas de p834, p873, y p917.

La figura 15 es una alineación de la secuencia de p834, p873, y p917.

10 La figura 16 es una alineación de secuencias de p834 y Aflibercept.

La Figura 17 es una transferencia Western que muestra anti-PDGFR más detección anti-Fc de PDGFR-Fc y VEGFR-Fc secretado a partir de un dispositivo de carga combinada.

Descripción detallada de la invención

15 Las proteínas son una clase dominante de agentes terapéuticos utilizados en el tratamiento de las enfermedades oculares. Sin embargo, los medicamentos que consisten en proteínas grandes a base de anticuerpos no son capaces de evitar la barrera sangre-retina y, por lo tanto, requieren de una administración intraocular repetida para el tratamiento. Previamente se ha demostrado que los dispositivos intraoculares de tecnología de células encapsuladas (ECT) pueden suministrar agentes bioterapéuticos directamente a los ojos constantemente en el transcurso de 2 años en los ensayos clínicos en humanos, lo que sugiere que esta tecnología se pueden extender a otros productos biológicos oftálmicos, así, por ejemplo, los relacionadas con la AMD húmeda.

20 Fueron sintetizadas secuencias de ADNc que representaban las principales clases de agentes biológicos de estructura de anticuerpos, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos completos, fragmentos Fab de anticuerpos, anticuerpos de cadena única (scFv), y moléculas de receptor de fusión-Fc. Se utilizaron vectores de expresión de ADNc para crear líneas celulares humanas estables que secretaban productos biológicos basados en anticuerpos deseados. Las líneas celulares se encapsularon posteriormente para crear implantes oculares ECT. La tasa de secreción de proteína se determinó por ELISA.

25 Las líneas celulares clonales cultivadas secretaron todas las clases de proteínas de estructura de anticuerpos, a la par con muchos sistemas de fabricación basados en la línea de células CHO. Las líneas celulares clonales exhibieron una fuerte secreción de la proteína recombinante, con niveles de algunas líneas celulares acercándose a 200 - 20.000 ng/millón de células/día (20 pcd). En algunas realizaciones, un proceso de transfección iterativo de una, dos, tres o más transfecciones se puede utilizar para modificar genéticamente las células. Sorprendentemente, una transfección iterativa y selección de ADN aumentan significativamente la capacidad de las líneas celulares para producir la secreción de la proteína recombinante a partir de 50.000 a más de 70.000 ng/millones de células/día (70 pcd). El proceso de transfección iterativo se puede utilizar para introducir múltiples copias de las mismas o diferentes estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas y/o moléculas anti-angiogénicas en las células (por ejemplo, células ARPE-19). Las moléculas producidas con un proceso de transfección iterativo que implica una transfección pueden ser denominadas moléculas de "primera generación". Las moléculas producidas con un proceso de transfección iterativo que implica dos transfecciones pueden ser denominadas moléculas de "segunda generación". Las moléculas producidas con un proceso de transfección iterativo que implica tres transfecciones pueden ser denominadas moléculas de "tercera generación".

30 Las líneas celulares productoras de agentes biológicos basados en estructuras de anticuerpos activos y de proteínas de fusión de receptor fueron encapsuladas con éxito, y la producción inicial de las proteínas recombinantes a partir de dispositivos individuales de ECT se detectaron inicialmente a niveles de hasta 50 a 1000 ng/día. Las líneas celulares transfectadas de ADN iterativo subsiguientes, en asociación con la optimización de los medios, aumentó los niveles del dispositivo ECT oftálmico hasta desde 4.000 a 10.000 ng/día.

35 Por lo tanto, estos dispositivos ECT pueden ser una plataforma de administración de fármaco eficaz para grandes moléculas biológicas incluyendo anticuerpos, estructuras de anticuerpos, y/o proteínas de fusión de receptor para indicaciones oftálmicas, así como indicaciones localizadas y/o sistémicas.

40 El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una proteína de señalización implicada en tanto la vasculogénesis, la formación del sistema circulatorio embrionario, como en la angiogénesis, el crecimiento de vasos sanguíneos a partir de vasculatura preexistente. Aunque el VEGF es principalmente conocido por sus efectos sobre las células del endotelio vascular, también afecta a una amplia gama de otros tipos de células, por ejemplo, estimulación migración de monocitos/macrófagos, neuronas, células cancerosas, células epiteliales de riñón, etc.

Hay un número de proteínas dentro de la familia VEGF, que surgen como resultado del corte y empalme alternativo del ARNm. Las diversas variantes de empalme impactan en la función de VEGF, ya que determinan si las proteínas resultantes son pro- o anti-angiogénicas. Además, las variantes de empalme también efectúan la interacción de VEGF con los proteoglicanos de sulfato de heparina (HSPGs) y co-receptores de neuropilina en la superficie celular, lo que, a su vez, mejora la capacidad de VEGF de unirse y activar los receptores de señalización de VEGF (VEGFR).

Las variantes de corte y empalme de VEGF son liberadas de las células como dímeros con enlaces disulfuro glicosilados. Estructuralmente, VEGF pertenece a la familia de PDGF de los factores de crecimiento de cisteína-nudo, y, por lo tanto, existen varias proteínas estrechamente relacionadas, es decir, el factor de crecimiento placentario (PlGF), VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D, que en conjunto comprenden la subfamilia VEGF de factores de crecimiento. VEGF en sí se conoce comúnmente como VEGF-A con el fin de diferenciarlo de estos otros factores de crecimiento relacionados.

La familia VEGF de proteínas estimula la respuesta celular mediante la unión a los VEGFR o a los receptores de tirosina quinasa presentes en una superficie celular. Los receptores de VEGF tienen una porción extracelular que consiste en siete dominios tipo inmunoglobulina, una sola transmembrana que abarca la región, y una porción intracelular que contiene una fracción de dominio de tirosina quinasa. VEGF-A se une tanto a VEGFR-1 (Flt-1) como a VEGFR-2 (KDR Flk-1). VEGFR1 se expresa como una tirosina quinasa de receptor de longitud completa (RTK), así como en una forma soluble, que lleva sólo el dominio extracelular. VEGFR-2 parece mediar la casi totalidad de las respuestas celulares que se sabe respecto a VEGF y se expresa en células progenitoras mesodérmicas que están destinadas a diferenciarse en hemangioblastos y angioblastos. La función de VEGFR-1 está peormente definida, aunque se piensa que modula la señalización de VEGFR-2. VEGF-C y VEGF-D, pero no VEGF-A, también son ligandos para un tercer receptor (VEGFR-3), que media la linfangiogenesis.

El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) es un factor de crecimiento que también juega un papel en la angiogenesis. Múltiples formas de PDGF existen, dímeros compuestos que contienen dos cadenas A (AA), dos cadenas B (BB), o una mezcla de una cadena A y B (AB). El PDGF es un potente mitógeno para los pericitos, una clase de células que sirven como soporte para el crecimiento celular endotelial. Existe el receptor de PDGF (PDGFR) en dos formas, alfa y beta. El PDGFR beta tiene la mayor afinidad por PDGF-BB y se ha demostrado que ejerce efectos biológicos anti-angiogénicos como una proteína secretada, o bien en la proteína de fusión - forma Fc o bien como un receptor soluble extracelular. Recientemente, la potente actividad anti-angiogénica sinérgica se ha demostrado en modelos de neogenesis vascular ocular en ratón que implicaban la combinación de moléculas anti-VEGF y moléculas de PDGF antagonistas. Así, una terapia de combinación anti-PDGF y anti-VEGF puede ejercer una actividad anti-angiogénica más alta que la terapia anti-VEGF sola.

Un gen de interés (es decir, un gen que codifica una estructura de anticuerpo anti-angiogénica dada o una molécula anti-angiogénica, tal como el receptor de VEGF o la construcción del receptor de PDGF de acuerdo con la invención) se puede insertar en un sitio de clonación de un vector de expresión adecuado utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica. Se conocen las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de los genes humanos (y otros mamíferos) que codifican las moléculas del receptor de VEGF. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nos. 4.997.929; 5.141.856; 5.364.769; 5.453.361; el documento WO 93/06116; el documento WO 95/30686.

Varios constructos específicos del receptor de VEGF truncado y/o receptor de PDGF se contemplan por la presente invención. También se contemplan estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas (es decir, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno y derivados de los mismos, anticuerpos de cadena sencilla, etc.) que interrumpen la unión de VEGF a sus receptores o PDGF a sus receptores. Por ejemplo, las proteínas solubles del receptor de VEGFR descritas en este documento comprenden fragmentos del receptor VEGF secretor 1 (sVRI), receptor VEGF secretor 2 (SVR2), y/o una quimera de los dominios de unión de VEGF del receptor de VEGF 1 y del receptor de VEGF secretor 2. Estas proteínas secretoras se unen a VEGF y contienen varios dominios tipo Ig. Varios dominios tipo inmunoglobulina, tanto de VR1 como de VR2, se usan en las construcciones de los receptores de VEGF solubles descritos en este documento. Los expertos en la técnica reconocerán que el dominio 2 (D2) es el dominio de unión a VEGF ("VBD") de sVRI, pero requiere el dominio 3 (D3) para la unión de VEGF de alta afinidad. Los truncamientos de sVRI que contienen los dominios de 1 a 3 (D1-3) o dominios 2-3 (D-3) se unen a VEGF con mayor afinidad que el dominio 2 solo. Además, estos truncamientos también neutralizan los efectos angiogénicos de VEGF. El VR2 tiene requisitos similares para la alta afinidad de la unión a VEGF, pero, además, debe ser dimérico, ya que la versión monomérica se une con una afinidad muy baja. Las diversas construcciones de receptores descritas en este documento incluyen los dominios 1, 2 y 3 de VR2 y una quimera del dominio 2 de VR1 y el dominio 3 de VR2. Las versiones pueden estar en forma monomérica o dimérica. El componente de dimerización de las construcciones de los receptores de VEGF solubles descritos en la presente memoria es la región Fc de longitud completa.

En otro ejemplo, los dominios extracelulares beta PDGFR 1-5 han demostrado que se unen a PDGF. El truncamiento de los dominios extracelulares beta PDGFR a 1-3 también se une a PDGF. Por lo tanto, las combinaciones de estos dominios extracelulares solubles nativos, o como proteínas de fusión permitirá la creación de un antagonista soluble de PDGF. El uso de antagonistas de beta PDGFR puede complementar los efectos anti-angiogénicos de los antagonistas de VEGF como se muestra en varios modelos de neovascularización ocular. (Jo et al., 2006).

La invención también proporciona estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas y proteínas de fusión de receptor que se derivan de (y/o son biosimilares a) compuestos conocidos anti-VEGF y fragmentos de los mismos biorreactivos. Por ejemplo, los compuestos anti-VEGF conocidos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos de receptor anti-VEGF (es decir, Aflibercept) y/o anticuerpos anti-VEGF (o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) (es decir, Bevacizumab, DrugBank DB00112; o Ranibizumab DrugBank DB01270)). Las secuencias de estos compuestos anti-VEGF conocidos son conocidas en la técnica. En otros ejemplos, también se han descrito fragmentos bioactivos de receptores de PDGF antagonistas en la literatura (Heidaran et al, 1990; Heidaran et al, 1995; Nakamura et al., 2001)

Las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas y las construcciones de receptores de VEGF específicas de la invención incluyen:

1) p834 (VEGFR-Fc N° 1, [RS-VEGF receptor 1, Dominio 2 y VEGF receptor 2, dominio 3 (R1D2-R2D3)] - EFEPKSC-hlgG Fc)

2) p838 (VEGFR-Fc N° 2, [VEGF receptor 2, Dominios 1, 2, y 3 (R2D1-R2D2- R2D3)])

3) p876 (anticuerpo VEGF ScFv N° 1, con cola de His)

4) p913 (VEGF ScFv N° 2, sin cola de His)

5) p873 (Aflibercept, VEGFR-Fc N° 3, receptor de VEGF 1, Dominio 2 y receptor de VEGF 2, dominio 3 (R1D2-R2D3) hlgG Fc)

6) p874/p875 (bevacizumab, anticuerpo completo de VEGF N° 1, cadena pesada/cadena ligera)

7) p915/p914 (ranibizumab, anticuerpo de VEGF Fab, fragmento de cadena pesada/cadena ligera)

8) p916/p914 (ranibizumab, anticuerpo completo de VEGF N° 2, cadena pesada/cadena ligera)

9) p917 (VEGFR-Fc N° 1, [receptor de RS-VEGF 1, Dominio 2 y receptor de VEGF 2, dominio 3 (R1D2-R2D3)] - hlgG Fc)

Las construcciones de VEGF descritas por primera vez en el presente documento son superiores a las construcciones del receptor de VEGF descritas en el documento WO 09/14920S. Específicamente, las construcciones del receptor de VEGF que carecen de la cola Fc (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 12 del documento WO 09/149205) eran o bien altamente inflamatorias en modelos animales o no podían convertirse en líneas celulares estables. Cada una de las construcciones en la solicitud WO09/149205 incluía la región bisagra IgG pero no la cola Fc. Como resultado, estas construcciones son todas moléculas tipo F(ab)-2. Los expertos en la técnica reconocerán que las proteínas F(ab)'2 se ha publicado que muestran inmunogenicidad. (Véase Fumia et al., Molecular Immunology. 45: 2951-61 (2008); Lutz et al, Autoinflammatory Reviews 7: 508-13 (2008).

Un descubrimiento sorprendente de la presente invención es que las construcciones de los receptores de VEGF que contienen la región bisagra IgG más la cola Fc, tal como, por ejemplo el constructo p834 (SEQ ID NO: 1), produjo mucho menos respuesta inmunológica en conejos y ninguna en entornos clínicos.

Tres de las construcciones descritas en este documento, p834 (VEGF-Fc), p873 (Aflibercept), y p917 (Aflibercept RS) tienen ligeramente diferentes secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, las diferencias entre p834 y p873 incluyen los siguientes:

a. 834 contiene el aminoácido RS entre el péptido señal y la proteína madura

b. 834 contiene EFEPKSC en la articulación

c. 834 contiene el terminal K (natural)

d. 873 contiene los sitios recombinantes 5' attB1 y 3' attB2 (no traducido)

Además, una nueva molécula Aflibercept RS (p917) fue creada basada en p873, pero elimina attB1 y attB2 y agrega de nuevo en el aminoácido RS entre el péptido señal y la proteína madura. Estas diferencias de secuencias se ilustran esquemáticamente en la Figura 14, y una alineación de secuencia se muestra en la Figura 15. Una alineación de secuencias de p834 y Aflibercept se muestra en la Figura 16.

Sorprendentemente, p834 superó inesperadamente (es decir, produce más de la estructura de anticuerpo anti-angiogénica) tanto a las construcciones p873 como p917.

Por lo tanto, p834 es tanto estructuralmente diferente y exhibe ventajas sorprendentes e inesperadas respecto a otras construcciones conocidas en la técnica (es decir, p873) y construcciones que se generaron en base a estas construcciones conocidas (es decir, p917).

Las líneas celulares se generaron en base a la 834, 873, y 917 y se midió el resultado de la estructura de anticuerpo anti-angiogénica. Los resultados se resumen a continuación.

Líneas celulares derivadas	PCD	Comentario
834-10-5	~15 PCD	Se vuelve la base para los dispositivos ECT de segunda y tercera generación
873 (Aflibercept biosimilar verdadero)	~2 PCD	Podría no conseguir alta expresión de línea celular usando técnicas estándar
917 ("Aflibercept RS" (a mitad de camino entre Aflibercept verdadero y 834))	NINGUNO	Inestable. Incapaz de generar línea celular

5 La transfección de p834 (también p910, p969) da como resultado la generación de clones de alta expresión cada vez. Por lo tanto, aparentemente hay alguna ventaja sobre p834 que está ausente de 873 o 917 - siendo potencialmente una bisagra más larga con cisteína adicional que confiere una estabilidad de molécula adicional.

Los constructos específicos de los receptores de PDGF anti-angiogénicos de la invención incluyen:

- 10) p964 (dominios PDGFR-beta 1-5 de fusión del receptor-IgG4 Fc)
- 11) P963 (dominios PDGFR-beta 1-5 de fusión del receptor-IgG1 Fc)
- 10 12) p974 (dominios PDGFR-beta 1-3 de fusión del receptor-IgG1 Fc)
- 13) p978 (dominios PDGFR-beta 1-5 de receptor)
- 14) p977 (dominios PDGFR-beta 1-5 de receptor más marcador His6)

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos específicos de cada uno de estos constructos se muestran a continuación.

15 A efectos de claridad, las construcciones, las líneas celulares y las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas y/o moléculas anti-angiogénicas de la presente invención se identifican como sigue en la presente solicitud: "pXXX" se refiere a un plásmido (por ejemplo, el plásmido p834), "XXX-X-XX" se refiere a una línea celular (por ejemplo, la línea celular 834-10-5), y "XXX" se refiere a una molécula (por ejemplo, la molécula 834). Sin embargo, los expertos en la técnica reconocerán que cualquiera de las estructuras y los constructos y las líneas celulares en base a la invención pueden ser denominadas, identificadas, y/o demarcadas de forma intercambiable en este documento.

25 En algunas realizaciones, la misma molécula puede ser introducida en diferentes vectores de expresión, haciendo mediante ello diferentes plásmidos. Por ejemplo, el ADNc de la molécula 834 se puede introducir en el vector resistente a blasticidina libre de pCpG vitro para hacer el plásmido del ADNc p834. Alternativamente, la molécula 834 también se puede introducir en el vector resistente a la neomicina libre de pCpG vitro para hacer el plásmido p910; o en el vector resistente a la pCpG higromicina para hacer el plásmido p969 (véase, Ejemplo 7).

30 Usando el proceso de transfección iterativo descrito en este documento, se pueden incorporar múltiples copias de las mismas (o diferentes) estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas y/o moléculas anti-angiogénicas en una célula (por ejemplo, una célula ARPE-1). Por ejemplo, cuando el proceso de transfección iterativo introduce dos transfecciones, se genera una construcción de segunda generación (910), que contiene dos copias del cDNA 834. Del mismo modo, cuando el proceso de transfección iterativo introduce tres transfecciones, se genera una construcción de tercera generación (969), que contiene tres copias del cDNA 834.

35 Como se muestra en la Figura 17, la línea celular 963 PDGFR-Fc y las líneas de células de VEGFR-Fc 910(834) de segunda generación se encapsularon ya sea como líneas de células individuales o como una mezcla de líneas de células ("carga combinada") en un solo dispositivo ECT. El análisis Western blot del medio de condición del dispositivo después de 2 horas de cultivo revela que los dispositivos de carga combinada secretan tanto las proteínas 963 PDGFR-Fc como 910(834) VEGFR-Fc simultáneamente.

p834

atggtcagctactgggacacccgggtcctgctgtgcgcgctgctcagctgtctgcttctcacaggatc
tagttcaggttcggaagtacacaggtagaccttctgtagagatgtacagtgaaatccccgaaatta
tacacatgactgaaggaaggagctcgtcattccctgcccgggttacgtcacctaacatcactgttact
ttaaaaaagtttccacttgacactttgatccctgatggaaaacgcataaatctgggacagttagaaaggg
cttcatcatatcaaatgcaacgtacaaaagaaatagggcttctgacctgtgaagcaacagtcaatgggc
atgtgtataagacaaaactatctcacacatcgacaaaaccaatacaatcctcgatgtggttctgagtccg
tctcatggaattgaactatctgttggagaaaagcttgtcttaaattgtacagcaagaactgaactaaa
tgtggggattgacttcaactgggaatacccttcttcgaagcatcagcataagaaacttgtaaaccgag
acctaaaaaccagctctgggagtgagatgaagaaatcttctgagcaccttaactatagatgggtgtaacc
cggagtgaccaaggattgtacacctgtgcagcatccagtgggctgatgaccaagaagaacagcacatt
tgtcagggctccatgaaaaagaattcgagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcc
cagcacctgaactcctggggggaccgtcagctcttctcttcccccaaaaaccaaggacacctcatg
atctcccggaacctgaggtcacatgctggtgggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagtt
caactggtagctggagcggctggaggtgcataatgccaaagacaaagccggggaggagcagtaaca
gcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaag
tgcaaggtctccaacaaagcctcccagccccatcgagaaaaccatctccaagccaaagggcagcc
ccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctga
cctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggg
aacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcac
cgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcaca
accactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa (SEQ ID NO:1)

mvsywdtgvllcallsc11ltgsssgsrsdtgrpfvemyseipeihmtgrelvipcrvtspnitvt
lkkfpldtlipdgkriiwdsrkgfiisnatykeiglltceatvnglhlyktnylthrgtntiidvvlsp
shgielsvgeklvlnctartelnvgidfnweypsskhqhklvnrldktqsgsemkflstltidgvt
rsdqglytcaassglmtkknstfvrvekefepkscdkthtppcpapellggpsvflfpkpkdtlm
isrtpevtcvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeyk
ckvsnkalpapiektiskakgpprepqvytlppsrdeltnqvsltclvkgfypsdiavewesnggpe
nnykttppvldsdsqfflyskltvdkrsrwqqnfvscsvmhealhnhytgkslslspgk (SEQ ID

NO: 2)

p838

atggagagcaagggtgctgctggcggctgcgcctgtggctetgogtggagaccggggccgcctctgtggg
tttgectagtgtttctcttgatctgccagggtcagcatacaaaaagacatacttacaattaaggcta
atacaactcttcaaattacttgcaggggacagaggacttggactggcttggcccaataatcagagt
ggcagtgagcaaaagggtggagggtgactgagtgacagcagcagtgagcctctctgtgaagacactcacaattcc
aaaagtgatcgaaatgacactggagcctacaagtgttctaccgggaaactgacttggcctcggtca
tttatgtctatgttcaagattacagatctccatttattgctctgtttagtgaccaacatggagtcgtg
tacattactgagaacaaaaaactgtgggtgatccatgtctcgggtccatttcaaatctcaactg
gtcacttgggaagatacccagaaaagagattgttccctgatggtaacagaatttccctgggacagca
agaagggtcttactattccagctacatgatcagctatgctggcagtggtctctgtgaagcaaaaatt
aatgatgaaagttaccagctctattatgtacatagttgtcgtttaggggataggatttatgatgtgg
ctgacttaaatgtggggattgacttcaactgggaatacctctctogaagcatcagcataagaaactt
gtaaacggagacctaaaaaccagctctgggagtgagatgaagaatttttggacccttaactataga
tgggttaaccgggagtgaccaaggattgtacacctgtgcagcatccagtgggctgatgaccaagaaga
acagcacatttgcagggctccatgaaaaacctttgttgccttttgggaagtggcgaattcgagcccaa
tcttgtgacaaaactcaacatgcccacggctgccagcactgaactcctggggggaccgctcagctct
cctcttcccccaaaaaccgaagcaccctcatgatctccgggaccctgaggtccatgctgggtgg
tggcagtgagcccaagaacctgaggtcaagtccaactggtaoctggacggcgtggaggtgcataat
gccaagacaaaagcccgggaggagcagtaacaacagcagcgaacctgtgggtcagcgtcctcaccgtcct
gcaccaggactggctgaatggcaaggagtaacaagtgaaggctccaacaaagccctcccagccccca
tcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccggagaaccacaggtgtacacctgccccatcc
cgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgggtcaaaagcttctatcccagcgacat
cgccgtggagtgaggagcaatgggcagccgggagaacaactacaagaccaagcctcccgtgctggact
ccgaeggctcctcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaaagctc
ttctcatgctccgtgatgcagtgaggtctgcacaaccactacagcagaagagcctctccctgtctcc
gggtaa (SBQ ID NO:3)

meskvlavalwlcvetraasvglpvsldlprlsiqkdiltikantllqitcrqgrlddlwlpnngs
gseqrvevtecsdglfcktltipkvigndtgaykcfyretdlasviyvvyqdyrspfiavsdqhgvv
yitenknktvvpclgsianlnvslcarypekrfvpdgnriawdskkgftipsymisyagvlfcaaki
ndeeyqsinyivvvgyriydvvlspahgielsvgeklvlnctartelnvgidfnweyppskhkhkl
vnrldlktqsgsemkkflstltidgvtredqglytcaasglmtkknstfvrvhkpfvafgsggefepk
scdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhn
aktkpreeqymstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakggprepqvytlpps
rdeltknqvsltlvkgfypsdiaveweenggpennyktpvldsdgefflyskltvdkrswgggnv
fscsvmhealhnhytqkslsispkk (SBQ ID NO:4)

p876

atggacatgccccggtgccagctcagctgctgggaactgctgctgctgtggctgcccgaccagatgaga
catccagctgaccagtcceccctccagcctgtccgcctctgtggcgacagagtgaccatcacctgtt
ccgcctcccaggacatcagcaactacctgaactggtatcagcagaagcccggaaggcccccaagggtg
ctgatctacttaccagcagcctgcactccggcgtgcccctcccggttctccggctccggctccggcacc
cgacttaccctgaccatctccagcctgcagcccgaggacttcccactactactgcccagcagtaaca
gcacctgcccctggaccttcggccagggcaccaaggtggaaatcaagggaggtggagggaagcgggtgga
ggaggtagcggaggcggcgccagcaggtgcagctgggtggaatccggcgaggactggtgcagcctgg
cggctccctgagactgtcttgcgcgcctccggctacgacttccccactacggcatgaaactgggtcc
gacaggccccctggcaagggactggaatgggtgggctggatcaacacctacaccggcgagcccacctac
gcgcagacttcaagcggcggttccacctcagcctggacaccagcaagagcaccgctacctgagat
gaactcctgccccggaggaaccccgctgtaactactgcccagtagccctactactacggcacca
gccactggtacttcagcgtgtggggccagggcaccctgggtcaccgtctcctcaccatcaccaccac
cac (SBQ ID NO:5)

mnmrvpaqlglgllllwlpgtrediqitqspsslaavgdrrvtitcsasqdisnylnwyqqkpgkapkv
liyftsalhsqvprrfsgsgsgtdftltisslqpedfatyyccqyastvpwtfgggtkveikggggsgg
ggsgggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgydfthygnnwrvrqpqgkglewvfwintytgepty
aadfkrrftfslatstktaylqnnslraedtavyycakypyyygtshwyfdvwgqgltvtvashhhh
h (SEQ ID NO:6)

p913

atggacatgccccgggagctcagctgctgggactgctgctgctggctgcccggcaccagatgga
catccagctgaccagctccccctccagcctgtccgctctgtggggacagagtgaccatcacctgtt
ccgctcccaggacatcagcaactacctgaactggatcagcagaagccccggcaaggcccccaagggtg
ctgatctacttcaccagcagcctgcactccggcgctgcccctccgggttctccggctccgggtccggcac
cgacttcacctgaccatctccagcctgcagccggaggacttcggcactactactgcccagcagtaca
gcaccgtgcccctggaccttcggccagggcaccagaagggtggaatcaaggagggtggaggaagcgggtgga
ggaggtagcggaggcggcgccagcggaggtgcagctgggtggaatccggcggaggactgggtgcagcctgg
cggctccctgagactgtcttgcccgcctccggctacgacttcaccactacggcatgaactgggtcc
gacaggccccctggcaagggtggaatgggtgggtggatcaaacctacaccggcgagcccacctac
gcgcgcgacttcaggcggcggttcaccttcagcctggacaccagcaagagcaccgctacctgcagat
gaactcctccggggccgaggacaccgctgtactactgcgccaagtacccctactactacggcacc
gccactggctacttcagcgtggtggggccaggccacctggtcacctctccctca (SEQ ID NO:19)

mnmrvpaqlglgllllwlpgtrediqitqspsslaavgdrrvtitcsasqdisnylnwyqqkpgkapkv
liyftsalhsqvprrfsgsgsgtdftltisslqpedfatyyccqyastvpwtfgggtkveikggggsgg
ggsgggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgydfthygnnwrvrqpqgkglewvfwintytgepty
aadfkrrftfslatstktaylqnnslraedtavyycakypyyygtshwyfdvwgqgltvtvss (SEQ
ID NO:20)

p873

atggtcagctactgggacaccgggggtcctgctgtgcgctgctcagctgtctgcttctcacaggatc
tagttcaggtagtgatacaggttagaccttctgtagagatgtacagtgaaatccccgaaattatacaca
tgactgaaggaagggagctcgtcattccctgcccgggttacgtcacctaacatcactgttactttaaaa
aagtttccacttgacactttgatccctgatggaaaaacgcataaatctgggacagttagaaagggtctcat
catatcaaatgcaacgtacaagaatagggtctctgacctgtgaagcaacagtcactgggcatttgt
ataagcaaaactatctcacacatcgacaaaaccaatacaatcatogatgtgggtctgagtcctctcat
ggaattgaactatctgttgagagaaaagcttgtcttaattgtacagcaagaactgaactaaatgtggg
gattgacttcaactgggaatacccttcttcgaagcatcagcataagaaacttgtaaacggagacctaa
aaaccagctctgggagtgagatgaagaaaatltttgagcaccttaactatagatgggtgaaccggaggt
gaccaaggattgtacacctgtgcagcaccagctgggctgatgaccaagaagaacagcacatttctcag
ggctcatgaaaaagacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcactgaactcctggggggaccgt
cagttctctcttctccccccaaaaccacaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgc
gtgggtggagctgagccagaagaccctgaggtcaagttcaactgtacgtggacggcgtggaggt
gcataatgccaaagacaaaagcggggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtgggtcagcgtcctca
cgtctctgcaccaggactgggtgaaatggcaaggagtaaaagtgaaggcttccaacaaagccctcca
gcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggccagcccggagaaccacaggtgtacaccctgcc
cccatccgggatgagctgaccaagaaccagggtcagcctgacctgacctgggtcaaaaggtctctatcca
gcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccgggagaacaactacaagaccacgctcccggtg
ctggactccgacggctccttctctctacagcaagctcacogtggacaagagcaggtggcagcaggg
gaacgtcttctcatgctcgtgatgatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccc
tgtctccgggt (SEQ ID NO:7)

mvsywdtgvllicallsllltgassgsdtgrpfvemyseipeiihmtgrelvipcrvtspnitvltk
kfpldtlipdgkriiwdrkgfiisnatykeiglltceatvnhglyktnylthrgntiidvvlapsh
gielsvgeklvlnctartelnvgidfnweyppsakhghkklvnrdlktqsgsemkklflatltidgvtrs

dqglytcaasaglmkknstfvrvehkdkthtcppepapellggpsvflfppkpkdtlmiartpevtc
 vvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvankalp
 apiektiskakgpprepqvylppsrdeitknqvsitclvkgfypediaaveasngppennykttppv
 ldsdgsfflyakltvdkerwqqgnvfesvmhealhnhytqklslspsg (SEQ ID NO:8)

p874

atggactggacctggtctatcctgttccctgggtggcogctgcaaccggcacctactccgaggtgcagct
 ggtggaatccggcggaggactggtgcagcctggcggctccctgagactgtcttgcgcgcctccggct
 acaccttcaccaactacggcatgaactgggtccgacaggccctggcaagggactggaatgggtgggc
 tggatcaacacctacaccggcgagccacctacgcccggacttcaaggcgggttccacctcagcct
 ggacaccagcaagagcaccgcctacctgcagatgaactccctgogggcagagacaccgcogtact
 actgcgccaagtacccccactactacggcagcagccactggtaacttcgacgtgtggggccagggcacc
 ctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctctccaagag
 caactctggggccacagcggcctgggctgcttggtaaggactacttcccgaaccggtgacgggtgt
 cgtggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccggctgtcctacagtcctcaggactc
 tactccctcagcagcgtggtgaccgtgacctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgt
 gaatcacaagcccagcaaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcaca
 catgcccaccgtgcccagcactgaactcctggggggaccgtcagcttctcttccccccaaaacc
 aaggacacctcatgatctccccggaccctgaggtcacatgctggtgggtggaagtgagccaaga
 cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccggg
 aggagcagtaacaacagcagctaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtctgcaccaggactggtgaa
 ggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccacagagaaaaccatctccaa
 agccaaagggcagccccgagaaccaaggtgtacacctgcccccatccgggatgagctgaccaaga
 accaggtcagcctgacctgctggtcaaaggtctctatcccagcagatcccggtggagtgggagagc
 aatgggcagcccggagaacaactacaagaccacgcctcccgctgctggactccgacggctccttctct
 ctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgc
 atgaggtctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa (SEQ ID
 NO:9)

mdwtswilflvaaatgtysevqlvesggglvqpgslrlscaasgytftnygnwvrqapgkglewv
 wintytgeptyaadfkrrftfsldekataylgnalraedtavyycakyphygshwyfdvwggt
 lvtvsaastkppvflpapsakstaggtaalgclvkdyppepvtvswngaltagvhtfpavlgssgl
 yslasvvtvpsalgtqtyicnvnhkpantkvdkkvepkscdkthtcppepapellggpsvflfppk
 kdtlmiartpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwl
 gkeykckvankalpapiektiskakgpprepqvylppsrdeitknqvsitclvkgfypediaaveas
 ngppennykttppvldsdsfflyakltvdkerwqqgnvfesvmhealhnhytqklslspsgk
 (SEQ ID NO:10)

p875

atggacatgcccgggtgccagctcagctgctgggactgctgctgctggtgctcccggcaccagatgoga
 catccagatgaccagctccccctccagcctgtccgctctgtggggcagacagagtaccatcactggt
 ccgctcccaggacatcagcaactacctgaactggtatcagcagaagcccgcaaggcccccaaggtg
 ctgatctacttaccagcagcctgcactccggcgtgacctccgggtctccggctccggcacc
 cgacttccacctgaccatctccagcctgcagcccaggacttgcaccctactactgccagcagta
 gcaccgtgacctggaccttccggccagggcaccaaggtggaaatcaagcggaccgtggccgctccctcc
 gtgttcatcttcccacctccgacgagcagctgaagtcgggaccgcctccgctcgtctgctgctgaa
 caacttctacccccggaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcctcagtcggcaccctccc
 aggaatccgctcaccgagcaggactccaaggacagcactactccctgtcctccacctgacctgtcc
 aaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgctgcgaagtgaccaccagggcctgtccagcccggt
 gaccaagctcttcaaccggggcagagtgc (SEQ ID NO:11)

mdmrpvaqlglglllwlpgtrcdiqmtqspsslsasvgrvtitccasqdiensylnwyyqkpgkpkv
 liyftsalhsgvparfsgsgsgtdftltisllqpedfatyyccqyvtvpwtfqggtkveikrtvaaps

vfifppedeqlksgtasvvc1lnnfypreakvqkwkdnalqsgnsqesvteqdskdstylsastlts
kadyekhkvacyacevthqglaspvtksfnrgec (SEQ ID NO:12)

p915

atggactggacctgggtctatcctgttccctgggtggccgctgcaaccggcacctactccgaggtgcagct
gggtggaatccggcggaggactgggtgcagcctggcgggtccctgagactgtcttgccgcgctccggct
acgacttcacccactacggcatgaaactgggtccgacaggccctggcaaggactggaatgggtgggc
tggatcaacacctaaccggcagaccacctaaccgcccgaactcaagcggcgggtccacctcagcct
ggacaccagcaagagcaccgctactgcagatgaaactccctggggccgaggacaccgcccgtgtact
actggccaagtaccctactactaaggcaccagccactgggtacttcgacgtgtggggccaggccacc
ctggctaccgctcctcagcctccaccaaggcccatcggctcttccccctggcaccctcctccaagag
cacctctgggggacagcggccctgggtgctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtg
cgtggaaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccggctgtcctacagtcctcaggactc
tactccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaaccagacctacatctgcaacgt
gaaacacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacc
tg (SEQ ID NO:13)

mdwtwilflvaaatgtysevqlvesggglvqpggslrlscaasgydfthygmwvrqapgkglewvg
wintytgeptyaadfkrftfaldtsketaylqmnalraedtavyycakypyytshwyfdvwqgt
lvtvsaastkppavfplapaskatsggtaalgclvkdyfpepvtvswmsgaltsgvhtfpavlsaagl
ylsaavvtvpssalgtqtyicnvnhkpentkvdkkvepkscdkthl (SEQ ID NO:14)

p914

atggacatgccccgggtgccagtcagctgctgggactgctgctgctgctgggtgccccggcaccagatgcga
caccagctgaccagctccccctccagcctgtccgctctgtggggagacagagtaccatcacctgtt
ccgctccaggacatcagcaactacctgaaactgggtatcagcagaagcccccgaaggcccccaaggtg
ctgatctacttcaccagcagcctgcactccggcgtgccctccgggttctccggctccggctccggc
cgacttcacctgaccatctccagcctgcagcccgaggacttcgcccactactactgcccagcagta
gcaacctgccctggaccttcggccaggccaccaaggtggaaatcaagcggaccgtggccgctccctcc
gtgttcattctccaccctccgacgagcagctgaaagtcggccaccgctccgctcgtctgctgctgaa
caactctacccccggcaggcccaaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagtcggcgaactccc
aggaatccgctcaccgagcaggactccaaggacagcactactccctgtcctccacctgacctgtcc
aaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaagtgacccaccaggccctgtccagcccctg
gaccaagtccttcaaccggggcgagtgcc (SEQ ID NO:15)

mdmrvaqllgllllwlpgrtdiqltqspssalsasvgrvtitccasqdiisnylnwyqqkpgkapkv
liyftsalhsqvprrfsgsgsgtdftltlisslqpedfatyyccqyavtvpwtfgggtkveikrtvaape
vfifppedeqlksgtasvvc1lnnfypreakvqkwkdnalqsgnsqesvteqdskdstylsastlts
kadyekhkvacyacevthqglaspvtksfnrgec (SEQ ID NO:16)

p916

atggactggacctgggtctatcctgttccctgggtggccgctgcaaccggcacctactccgaggtgcagct
gggtggaatccggcggaggactgggtgcagcctggcgggtccctgagactgtcttgccgcgctccggct
acgacttcacccactacggcatgaaactgggtccgacaggccctggcaaggactggaatgggtgggc
tggatcaacacctaaccggcagaccacctaaccgcccgaactcaagcggcgggtccacctcagcct
ggacaccagcaagagcaccgctactgcagatgaaactccctggggccgaggacaccgcccgtgtact
actggccaagtaccctactactacggcaccagccactgggtacttcgacgtgtggggccaggccacc
ctggctaccgctcctcagcctccaccaaggcccatcgggtcttccccctggcaccctcctccaagag
cacctctgggggacagcggccctgggtgctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtg
cgtggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccggctgtcctacagtcctcaggactc
tactccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaaccagacctacatctgcaacgt
gaaacacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcaca

catgccaccctgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagctcttctcttccccccaaaacc
 aaggacacccatcatgatctccccgaccctgaggtcacatgogtgggtggaogtgagccacgaaga
 cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggogtggaggtgcataatgccaaagcaaaagccgoggg
 agggacagtaaacagcacgtaccgtggtgagcgtcctcaocgtcctgcaccaggactggctgaat
 ggcaaggagtaaacgtgcaaggtctccaacaaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaa
 agccaaagggcagccccgagaaccaaggtgtacacccctgccccatccccgggatgagctgaccaaga
 accaggtcagcctgacctgctgggcaaaagctctctatcccagcgacatcgocgtggagtgaggagagc
 aatgggcagccgggagaacaactacaagaccacgocctcccgctgctggactccgaaggtccttctct
 ctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcogtgc
 atgaggtctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaa (SEQ ID NO:
 17)

mdwtwailflvaaatgtysevqlveagglvqpggslrlscaasgydfthygmwvrqapgkglewvg
 wintytgeptyaadfkrrftfaldtskataylqmslraedtavyycaakypyytshwyfdvwwggt
 lvtvsaastkppvflapasksteggtaalglvkdyfpepvtvewnaqaltogvhtfpavlgssgl
 yslsenvtvpasalgtyicnvnkhpantkvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkp
 kdtlmsrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhgdwln
 gkeykckvsnkalpapiektiskakggpprepqvytlppardeltknqvaltclvkgyfypediavewes
 nggpennykttpvldadgsfflyskltvdksrwqggvfvscsvmhealhnhytqkslslspgk
 (SEQ ID NO:18)

p917

atggtcagctactgggaacocgggggtcctgctgtgcgcgctgctcagctgtctgcttctcacaggatc
 tagttcaggttcoggaagtacacaggtgacaccttctgtagagatgtacagtgaaatccccgaaatta
 tacacatgactgaaggaaggagctcgtcattccctgcccgggttacgtcacctaacatcactgttact
 ttaaaaaagtttccacttgacactttgatccctgatggaaaacgcataatctgggacagttagaaaggg
 cttcatcatatacaaatgcaacgtacaagaatagggtctctgacctgtgaagcaacagtcactgggc
 atttgtataagacaaactatctcacacatcgacaaaaccaatacaatcatogatgtggtctctgagtcog
 tctcatggaattgaactatctggtggagaaaagcttctctaaattgtacagcaagaactgaactaaa
 tgtggggattgacttcaactgggaataaccttctcgaagcatcagcataagaaaacttgtaaacggag
 acctaaaaaccagctctgggagtgagatgaagaaattttgagcaccttaactatagatgggtgtaacc
 cggagtgaccaaggattgtacacctgtgcagcatccagtgggctgatgaccaagaagaacagcacatt
 tgtcaggggtccatgaaaaagacaaaactcacacatgcccacogtgeccagcaactgaactcctggggg
 gaccgtcagctcttctctccccccaaaaccccaaggacacccatgatctcccgaccctgaggtc
 acatgctggtggtggagctgagccacgaagacccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggogt
 ggaggtgcataatgccaaagcaaaagcccgggaggagcagtaaacagcagctaccgtggtcagcg
 tctccaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtaaacgtgcaaggtctccaacaaaagcc
 ctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacac
 cctgcccccatccccggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttct
 atcccagcagatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgocct
 cccgtgctggactccgaaggtccttctctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggca
 gcaggggaacgtcttctcatgctcogtgcagtgaggtctgcacaaccactacacgcagaagagcc
 tctcctgtctccgggt (SEQ ID NO:21)

mvsywdtgvllcallecllltgssegrredtgrpfvemyseipeihntegrelvipcrvtspnitvt
 lkfpldtllpdgkriiwdarkgfiiisnatykeiglltceatvnglyktnylthrtntiidvvlsp
 shgielavgeklvlnctartelnvgidfnweyepskhqhkklvnrldktgsgsenkkflstltidvgt
 redgyltcaasglmtkknstfvrvehkdktthtppcpapellggpsvflfppkpdtlmsrtpev
 tcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhgdwlngkeykckvsnka
 lpapiektiskakggpprepqvytlppardeltknqvaltclvkgyfypediavewesnggpennykttp
 pvldadgsfflyskltvdksrwqggvfvscsvmhealhnhytqkslslspg (SEQ ID NO:22)

p964

atgaggcttccgggtgcatgccagctctggccctcaaaggcgagctgctggtgctctctctggt
acttctggaaccacagatctctcagggcctggctcgcacacccccggggccagagcttgcctcaatg
tctccagcaecttctgttctgacctgctcgggttcagctccgggtggtggtgggaacggatgtcccaggag
ccccacaggaatggccaaggccaggatggcaocttctccagcgtgctcacactgaccaacctcac
tgggctagacacgggagaatacttttgcacccacaatgactcccgtggactggagaccgatgagcggga
aacggctctacatctttgtgccagatcccacctgggcttctcctcaatgatgccgaggaactatc
atctttctcagcggaaataactgagatcaccattccatgccagagtaacagaccacagctgggtggtgac
actgcacgagaagaaggggacgcttgcactgectgtcccctatgatcaccacagctggctttctggtat
tctttgaggacagaagctacatctgcaaaaaccaccattggggacagggagggtgattctgatgctac
tatgtctacagactccaggtgtcatccatcaacgtctctgtgaaocgagtgacagactgtggteccca
gggtgagaacatcaccctcatgtgcatgtgatcgggaatgaggtggtcaacttcgagtgagacatacc
cccgcaaaagaagtggggcggctgggtggagccgggtgactgacttctcttggatgatgcttaccacatc
cgtccatctctgcacatcccagtgccaggttagaagactcggggacctacacctgcaatgtgacgga
gagtgatgaatgacctcaggatgaaaaggccatcaacatcaccgtgggtgagagcggctacgtgaggc
tctgggagaggtgggacacactacaatttctgctgagctgcatcgggagccggacactgcaggtagtgtc
gaggcctaccacccgcccactgtctgtggttcaaaagacaaccgaccctggggcactccagcgtgg
cgaaatcgccctgtccacgcgcacagctgtcggagaccgggtatgtgtcagagctgacactggttcggg
tgaaggtggcagaggtggccactacaccatgcccggccttccatgaggatgctgaggtccagctctcc
ttccagctacagatcaatgtccctgtccaggtgctggagctaaagtgagagccacctgacagtgggga
acagacagtcocgtgtctgtggccgggcatgcccagccgaacatcatctggctgctgctgcagagacc
tcaaaaggtgtccacgtgagctgcccgcccaocgtgctggggaaacagttccgaagaggagagccagctg
gagactaacgtgacgtactgggaggaggagcaggagttgaggtggtgagcacactcogctctgcagca
cgtggatcggccactgtcgggtgctgcaocgtgccaocgtgtgggcccaggacacgcaggaggtca
tcgtggtgccacactcttgccttcaagccccatgcccacatgcccagcactgagttctctgggg
ggaccatcagttctctgttcccccaaaaaccgaaggacactctcatgatctcccggaccctgaggt
cacgtgctggtggtggactgagccaggaagacccccaggtccagttcaactggtacgtggatggcg
tggaggtgcataatgccaagacaagccggggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagc
gtctccacctctctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtccaaggtctccaacaaagg
cctcccgtctccatcgagaaaaccatctccaaaagcaaaagggcagccccagagaccacaggtgtaca
cctgcccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaagcttc
taccaccagacatcgccgtggagtgaggaggcaatgggcccgggagaadaactacaagaccagcc
tcccgtgctggactccgacggctctctctctctctacagcaggctaacctgggacaagagcaggtggc
aggaggggaatgtctctctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagc
ctctccctgtctctgggtaaa
(SBQ ID NO:23)

mrlpgampalalkgelllllelllllepgisggilvvtppgpelvlvnsstfvltccgsapvvermsqe
ppgenakaqdgthfssvltltnltgldtgeyfcthdnrsrgletderkrlyifvpdptvgflpndaeeif
iflteiteitipcrvtdpqlvvtlhekkgdvalpvydhqrgfsgifedrsyickttigdrevidsday
yyrlqvssinvasnavgtvvrqgenitlmcivignevvnfewtyprkaagrlvepvtdfllndmphyi
rsilhipsaeledsgtytcnvtcsvndhqdakainitvvesgyvrlgvegtlqfaelhrartlqvvf
eayppptvlwfkdnrtlgdssageialstrnvsetryvselvlrvkvaeaghytarafhedaevqls
fqlqinvpvrvlseishpdageqtvrgrgmpgnniwsacrdlkrprelptllgnsseesql
etnvtwyeeeqefevvstlrlqhvdrlsvrctlrnavgqdtqevivvphslpfpkppcpcpapeflg
gpsvflfppkpkdtlmiirtpevtcvvdvsqedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreaqfnstyrvvs
vltvlhqdwlngkeykckvsnkglpselektiskakggprepvytlppeqeemtknqvsltclvkgf
ypediaevewesngqpennykttppvldadgsfflysrlltvdkarwqegnvfscsvmhealhnhytqks
lslslgk (SBQ ID NO:24)

p963

atgaggcttccgggtgcatgccagctctggccctcaaaggcgagctgctggtgctctctctggt

acttctggaaccaagatctctcagggcctggtegtcaacccccggggccagagcttgtcctcaatg
tctccagcaccttcggtctgacctgctcgggttcagctccggtggtgtgggaacggatgtcccaggag
ccccacaggaatggccaaggcccaggatggcaaccttctccagcgtgctcacactgaccaacctcac
tgggctagacacgggagaatacttttgcacccacaatgactcccgaggactggagaccgatgagcggga
aacggctctacatctttgtgccagatcccaccgtgggcttctccctaatgatgccagggaactatc
atcttctcacggaaataactgagatcaccattccatgccagtaaacagaccacagctgggtgggtgac
actgcacgagaagaaggggacgttgcactgectgctcccctatgatcaccacagctgcttcttggtatc
tctttgaggacagaagctacatctgcaaacaccattggggacagggagggtgattctgatgectac
tatgtctacagactccaggtgctatecatcaacgtctctgtgaacgcagtgacagactgtggctccgcca
gggtgagaacatcacctcatgtgcatctgtgatcggaatgaggtggtcaacttcgagtgagacatacc
cccgcaaaagaaagtgggcggtgggtggagccgggtgactgacttctcttggtatagccttaccacatc
cgctccatctctgcacatcccagtgccaggttagaagactcggggacctacacctgcaatgtgacggga
gagtgtgaatgacctcaggatgaaaaggccatcaacatcacctggttgagagcggctacgtgcggc
tctggggagaggtgggcacactacaatttctgtgagctgcatcggagccggacactgcaggtaggttc
gaggctaccacccgcccactgctctgtggttcaaagacaaccgcacctggggcactccagcctgg
cgaaatcgccctgtccacgcgcaacgtgtcgggagaccgggtatgtgtcagagctgacactggttcg
tgaaggtggcagaggtggccactacaccatggggcccttccatgaggatgctgaggtccagctctcc
ttccagctacagatcaatgtcctgtccaggtgctggagctaatgagagccacctgacagtgggga
acagacagtcctgctgctggccggggcatgcccacccgaacatcatctggtctgcctgcagagacc
tcaaaaggtgtccagctgagctgcccacccgctgctggggaaacagttccgaagaggagagccagctg
gagactaacgtgacgtactgggaggaggagcaggagttaggtggtgagcacactgctctgcagca
cgtggatcgccactgtcgtgctgcctgcaacgtgctgggacagacacgcagagggtca
tcgtggtgcccacactccttgccttcaaggaccccagcccaaatcttctgacaaaaactcacacatgc
ccacctgcccagcacctgaacctctggggggacagctcagctctctctctcccccaaaacccaagga
cacctctatgatctccccggaccctgaggtcacatgctggtggtggagctgagccacgaagaccctg
aggtcaagttcaactggtacgtggaacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaagccgcccggaggag
cagtacaacagcagctacgtggtggtcagcgtctcaccgctctgaccaggactggctgaatggca
ggagtacaagtgcaaggtctccaaacaagccctcccagccccatcgagaaaaacatctccaaagcca
aagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccag
gtcagcctgacctgectggtcaaaggcttctateccagcagacatcccgtggagtgggagagcaatgg
gcagccgggagaacaactacaagaccacgctccctgctggaactccgaaggtcctctctctctaca
gcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtctctcatgctccgtgatgcagag
gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaa (SBQ ID NO: 25)

mrlpgampalalkgelllllslllllepqiaggvlvvtppgpelvlvnsatfvltcsgsapvwwernsqe
ppgemakagdgfssvltltnltgldtgeyfcthdargletderkrlyifvpdptvgflpndaeeelf
iflteiteitipcrvtdpqlvvtlhekkgdvalpvpydhqrgfegifedrsyickttigdrevdaday
yvyrllqvssinvsnavqtvvrrgenitlmcivignevvnfwtprkesgrlvepvtdflllmpyhi
rsilhipsaeledsgtytcnvtesvndhqdekainitvvesgyvrlgvegtlqfaelhrertlqvff
eayppptvlwfkdnrtlgdsaaageialstrnvsetryvaeltlvrvkvaeeaghytnrafhedaeavlq
fqlqinvpvrvlseeshpdageqtvrcrggmpqppniwsacrdlkrcrelppptllgnsseeeesql
etnvtwyeeeqefevvstlrqhvdrplsvrctlrnavgqdtqevivvphslpfdpdkpksodkthtc
ppcpapellggpsevflfppkpkdtlmiertpevtcvvvdvsbedpevkfnwyvdgvevhnaktkpre
qynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvankalpapiektiskakggprepqvytlppsrldeltnq
veltclvkgfypsdiaveveangqpennyktppvldadgsfflyakltvdkrwrqqgnvfscsvmhe
alhnhytgkalslspgk (SBQ ID NO: 26)

p974

atcgggcttccgggtgcatgccagctctggccctcaaaggcgagctgctggtgctgctctctctggt
acttctggaaccaagatctctcagggcctggtegtcaacccccggggccagagcttgtcctcaatg
tctccagcaccttcggtctgacctgctcgggttcagctccggtggtgtgggaacggatgtcccaggag
ccccacaggaatggccaaggcccaggatggcaaccttctccagcgtgctcacactgaccaacctcac
tgggctagacacgggagaatacttttgcacccacaatgactcccgaggactggagaccgatgagcggga
aacggctctacatctttgtgccagatcccaccgtgggcttctccctaatgatgccagggaactatc

atctttctcaggaataaactgagatcaccattccatgccagtaacagaccacagctggtggtgac
actgcacgagaagaaggggacgttgcaactgcoctgtcccctatgatcaccaacgtggettttctggta
tctttgaggacagaagctacatctgcaaaaaccaccattggggacagggaggtgattctgatgcctac
tatgtctacagactccaggtgtcatccatcaacgtctctgtgaacgcagtgacactgtggtccgcca
gggtgagaacatcacccctcatgtgcattgtgatcgggaatgaggtggtcaacttcagagtggacatacc
cccgcaaaagaagtggggcggtggtggagccgggtgactgacttccctctggatagccttaccacatc
cgctccatcctgcacatcccagtgccaggttagaagactcggggacctacacctgcaatgtgacggga
gagtgtgaatgaccatcaggatgaaaaggccatcaacatcacctggttgagagcgggtacgtgccc
tccctggagagcccataatctgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctg
gggggaccgtcagcttctcttccccccaaaaccacaggacacctccatgatctcccggacccctga
ggtcacatgctggtggtgggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagtcaactggtacgtggaacg
gcgtggagggtgcataatgccaagacaaaagccgcgggaggagcagtagcaacagcacgtacccgtggtc
agcgtcctcacctcctgaccaggactggtgaaatggcaaggagtacaagtcaaggtctccaaca
agccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaaagccaaaagggcagcccogagaaccacaggtg
acacctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggc
ttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaaactacaagaccac
gctcctcctgctggactccgacggctcctctctcctctacagcaagctcacctggacaagagcaggt
ggcagcaggggaacgtctctctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaag
agcctctcctgtctccgggtaaa (SEQ ID NO:27)

mrlpgampalalkgelllllalllllepqiagglvvtppgpelvlvstfvltccgsapvvwermgq
ppgenakagdgtfsvl:tlntlgldtgeyfetndsrletderkrlyifvdpvtvgflpndaelf
iflkteitipcrvtdpqllvvtlhekkgdvalpvpydhqrgfgifedrsyickttigdrevedsday
yyvrlqvaainvsvnavqtvvrqgenitlmciivignevvnfewtyprkesgrlvepvtdfllidpyhi
rsilhipaaeledsgtytcnvtcesvndhgdekainitvvesgyvrlgcpksedkthtccppcpapell
ggpsvflfppkpkdltmisrtpevtcvvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv
avltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepvvylppsrdeltnkqvslctlvkg
fypsdiaavewesngqpenykttppvldsdgsefflyskltvdksrwqggvfvscavmhealhnhytqk
slslspgk (SEQ ID NO:28)

p978

atgccccttccgggtgcgatgccagctctggccctcaaaaggcgagctgctggtgctgtctctctctg
acttctggaaccacagatctctcagggcctggctgcacacccccggggccagagcttgctcctcaatg
tctccagcaaccttctgttcaactgtctcgggttcagctccgggtggtggtgggaacgggatgcccaggag
ccccacaggaatggccaagggcccaggtggcaacctctccagcgtgctcacactgaccaacctcac
tgggctagacacgggagaatacttttgcaaccacaatgactcccgtggactggagaccgatgagcggga
aacggctctacatcttctgtccagatcccaccgtgggttctctcctcaatgatgccagggaactatc
atctttctcaggaataaactgagatcaccattccatgccagtaacagaccacagctggtggtgac
actgcaagagaagaaggggacgttgcaactgctgtcccctatgatcaccaacgtggettttctggta
tctttgaggacagaagctacatctgcaaaaaccaccattggggacagggaggtgattctgatgcctac
tatgtctacagactccaggtgtcatccatcaacgtctctgtgaacgcagtgacactgtggtccgcca
gggtgagaacatcacctcatgtgcattgtgatcgggaatgaggtggtcaacttcagagtggacatacc
cccgcaaaagaagtggggcggtggtggagccgggtgactgacttccctctggatagccttaccacatc
cgctccatcctgcacatcccagtgccaggttagaagactcggggacctacacctgcaatgtgacggga
gagtgtgaatgaccatcaggatgaaaaggccatcaacatcacctggttgagagcgggtacgtgccc
tccctgggagaggtgggcacactacaatttctgagctgcatcgggagccggacactgcaggtagtggtc
gaggcctaccccaccgcccactgtcctgtggttcaaaagacaaecgcacctggggcactccagcctgg
cgaaatcgccctgtccacggcgaacgtgtcggagaccgggtatgtgtcagagctgacactggttcg
tgaaggtggcagaggctggccactacaccatgccccctccatgaggatgctgaggtccagctctcc
ttccagctacagatcaatgtcctgtccagtgctggagctaagtgagagccacctgacagtgggga
acagacagtccgctgtcgtggccggggcatgcccagccgaacatcatctggtctgctgcagagacc
tcaaaagggtgctccagctgagctgcgccccacgtgctggggaaacagtccgaagaggagagccagctg
gagactaacgtgacgtactgggaggaggagcaggagttgaggtggtgagcacactgcgtctgcagca
cgtggatcggccactgtcgggtgcctgcaagctgcccacgctgtggggccaggacacgcaggaggtca
tctggtgcccacactccttgccttcaag (SEQ ID NO:29)

mrlpgampalalkgellllslllllepgiqsgllvvtppgpelvlvnsstfvltcsgsapvwwermsqe
 ppqemakaqdgdfssvltltnltgldtgeyfcethndergletderkrlyifvdpdvtvgflpndaeeif
 iflteiteitipcrvtdpqlvvtlhkkgdvalpvpydhqrgfsgifedrasyicktigdrevidaday
 yvyrqlqvssinvsnavqtvvrqgenitlmcivignevvnfewtyprkesgrlvepvtdfllmppyhi
 rsilhipsaeledsgtytcnvtesvndhqdekainitvvesgyvrlgvegtlqfaelhrxrtlqvff
 eayppptvlwfkdnrtlgdssageialstrnvsetryvseltlvrkvvaeaghytmrafhedaevqls
 fqlqinvpvrvillesehpdsgeqtvrcrgrgmpqpniiwsacrdlkrprelppptllgnssesesql
 etnvtwseegtefevvtlrlqhvdrplsvrctlrnavgqdtqevivvphslpfx (SEQ ID
 NO:30)

n977

atggggcagtgaggaaaagtggcactatgaacctgcagccctagacaattgtactaacctctctct
 ctctctctctctgacaggttggtgtacagtagcttccaagtactccaccatgcggcttccgggtgcga
 tgcagctctggccctcaaaaggagctgctggtgctgctctctctctggtactcttggaaaccacagatc
 tctcagggcctggctgctcacacccccggggccagagcttgctcctcaatgtctccagcactctctct
 gacctgctcgggttcagctccgggtggtgtgggaacggatgtcccaggagccccacaggaaatggcca
 aggccaggatggcactctctccagcgtgctcacactgaccaacctcactgggctagacacgggagaa
 taactttgcaaccacaatgactcccggtggactggagacgatgagcggaaaaggctctacatcttctg
 gccagatcccacgtgggctctctctctcaatgatgcccaggaaactattcatcttctcagggaaataa
 ctgagatcaccatctccatgcccagtaaacagacccacagctgggtggtgacactgcaacgagaagaagg
 gacgttgcaactgctgctccctatgatcaccaacgtggctttctggtatctttgaggacagaagcta
 catctgcaaaaaccaccattggggacaggagggtgattctgatgctactatgtctacagactccagg
 tctcatccatcaacgtctctctgtaacgcagtgacagactggtgctccagggtgagaacatcaccctc
 atgtgcattgtgatcgggaatgaggtggtcaactctcagtgacacatacccccgcaagaaagtgggcg
 gctgggtggagccgggtgactgacttctcttggatattgcttaccacatccgctccatctctgcaatcc
 ccagtgccgagttagaagactcggggacccacactgcaatgtgacggagagtgtaatgaccatcag
 gatgaaaaggccatcaacatcacctggttgagagcggctacgtgcccctctgggagaggtgggccc
 actacaatttctgagatgcatcggagccggacactgcaggtagtgttcgaggcctaccacccgccca
 ctgtcctctggttcaaaagacaaccgcacctggggcactccagcgtggcgaaaatcgccctgtccacg
 cgcaacgtgtcggagaccgggtatgtgtcagagctgacactggttccgctgaaggtggcagaggtgg
 ccactacaccatgcccggccttccatgaggatgctgaggtccagctctctctccagctacagatcaatg
 tccctgtccgagtgctggagcctaagtgagagccacctgacagtggggaaacagacagctccgctgctg
 ggccggggcatgccccagccgaacatcatctggtctgctgacagagacctcaaaagggtgtccacgtga
 gctgcccgccacgctgctggggaaacagttccgaagaggagagccagctggagactaacgtgacgtact
 gggagaggagcaggagtttgaggtggtgagcacactcgcctctgcagcagctggatcggccactgtcg
 gtgctgacagctgcccacagctgtgggcccaggacacgcaggaggtcatcgtggtgcccactctt
 gcccttcaagcggggcagccaccaccaccaccac (SEQ ID NO:31)

ngqcrksgtmnpaaldnctnlllfp1ltgwctvaskystmrlpgampalalkgellllslllllepgi
 sqglvvtppgpelvlvnsstfvltcsgsapvwwermsqppqemakaqdgdfssvltltnltgldtge
 yfcthdnrgletderkrlyifvdpdvtvgflpndaeeififlteiteitipcrvtdpqlvvtlhkkg
 dvalpvpydhqrgfsgifedrasyicktigdrevidadayyvyrqlqvssinvsnavqtvvrqgenitl
 mcivignevvnfewtyprkesgrlvepvtdfllmppyhirsilhipsaeledsgtytcnvtesvndhq
 dekainitvvesgyvrlgvegtlqfaelhrxrtlqvffeayppptvlwfkdnrtlgdssageialst
 rnvseryvseltlvrkvvaeaghytmrafhedaevqlsfqlqinvpvrvillesehpdsgeqtvrcr
 rgmpqpniiwsacrdlkrprelppptllgnssesesqlctnvtwseegtefevvtlrlqhvdrpls
 vrctlrnavgqdtqevivvphslpfxgshhhhhh (SEQ ID NO:32)

Puede usarse una amplia variedad de combinaciones huésped/vector de expresión para expresar el gen que codifica el factor de crecimiento, u otra molécula(s) biológicamente activa de interés. A largo plazo, la expresión estable in vivo se logra usando vectores de expresión (es decir, moléculas de ADN recombinante) en donde el gen que codifica la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o la molécula anti-angiogénica, tal como el receptor de VEGF o el receptor de PDGF, se une operativamente a un promotor que no está sujeto a regulación por disminución después de la implantación in vivo en un huésped mamífero. Los promotores adecuados incluyen, por ejemplo, promotores fuertes de mamíferos constitutivos, tales como beta-actina, eIF4A1, GAPDH, etc. También pueden ser adecuados promotores inducibles por estrés, tales como la metalotioneína 1 (MT-1) o un promotor de VEGF. Además, se pueden usar promotores híbridos que contienen un núcleo promotor y 5' UTR de costumbre o elementos potenciadores. Otros promotores no retrovirales conocidos capaces de controlar la expresión de genes, tales como CMV o los promotores temprano y tardío de SV40 o los adenovirus son adecuados. Los elementos potenciadores también pueden dar lugar a conferir una expresión génica adicional en ambientes desfavorables, tales como bajo O₂. Un ejemplo es el promotor de la eritropoyetina que confiere una sobre-regulación de los elementos génicos asociados bajo inducción hipóxica.

Los vectores de expresión que contienen el gen de interés pueden entonces ser utilizados para transfectar la línea celular deseada. Se pueden utilizar técnicas de transfección estándar, tales como liposomas, co-precipitación por fosfato de calcio, transfección de DEAE-dextrano o electroporación.

Se pueden comprar kits de transfección de mamíferos comercialmente disponibles, tales como Fugene6 (Roche Applied Sciences). Además, se pueden utilizar vectores virales para transducir la línea celular deseada. Un ejemplo de un vector viral adecuado es la familia pLenti disponible en el mercado de vectores virales (Invitrogen). Pueden ser utilizadas células de mamíferos humanos. En todos los casos, es importante que las células o el tejido que contiene el dispositivo no estén contaminados o adulterados. Para proteínas de estructura de anticuerpos que requieren componentes de la cadena pesada y ligera, pueden ser co-transfectadas simultáneamente construcciones dobles, codificando cada una un anticuerpo de cadena pesada o ligera relevante, dando lugar de ese modo a líneas celulares que expresan Fab bivalente funcional y moléculas de anticuerpos completos tetravalentes.

Los promotores preferidos utilizados en los constructos descritos incluyen el promotor SV40 y el promotor CMV/EF1 alfa, como se muestra en la Figura 1.

Otros vectores de expresión útiles, por ejemplo, pueden consistir en segmentos de secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas, tales como los diversos derivados conocidos de SV40 y plásmidos bacterianos conocidos, por ejemplo, los plásmidos pUC, pBluescript™ de *E. coli* incluyendo pBR322, pCRI, pMB9 y sus derivados. Los vectores de expresión que contienen genes de selección de los fármacos geneticina (G418), higromicina o blastidina (Southern, P. J., *In Vitro*, 18, p. 315 (1981), Southern, P. J. y Berg, P., *J. Mol. Appl. Genet.*, 1, p. 327 (1982)) también son útiles. Estos vectores pueden emplear una variedad de diferentes regiones potenciadoras/promotoras para conducir la expresión tanto de un gen biológico de interés y/o de un gen que confiere resistencia a la selección con toxina tal como G418, higromicina B, o blastidina. Una variedad de diferentes promotores de mamíferos se puede emplear para dirigir la expresión de los genes para G418 e higromicina B y/o el gen biológico de interés. Los genes de resistencia a G418 codifican para aminoglucósido fosfotransferasa (APH), que enzimáticamente inactiva G418 (100-1000 µg/µl) añadido al medio de cultivo. Sólo aquellas células que expresan el gen de APH sobrevivirán a la selección del fármaco, por lo general, resultando en la expresión del segundo gen biológico también. El gen de la higromicina B fosfotransferasa (HPH) codifica para una enzima que modifica específicamente la toxina higromicina y la inactiva. Los genes co-transfectados o contenidos en el mismo plásmido que el gen de la higromicina B fosfotransferasa se expresarán preferentemente en presencia de higromicina B a concentraciones de 50-200 µg/ml.

Ejemplos de vectores de expresión que se pueden emplear incluyen, pero no se limitan a, los disponibles en el mercado pRc/CMV (Invitrogen), pRc/RSV (Invitrogen), pCDNA/NEO (Invitrogen), pCI-neo (Promega), pcDNA3.3 (Invitrogen) y el sistema de vector GS (Lonza Group, Suiza). Otros vectores disponibles comercialmente adecuados incluyen pBlast, pMono, o pVitro. En una realización preferida, el sistema de vector de expresión es los vectores de expresión pCpGfree-vitro disponibles con genes de resistencia a la neomicina (G418), higromicina, y blastidina (InvivoGen, San Diego, CA) (Véase la Figura 1).

En una realización, se puede utilizar el vector de expresión pNUT, que contiene el ADNc del mutante DHFR y la secuencia entera de pUC18, incluyendo el polienlazante. Véase, por ejemplo, Aebischer, P., et al., *Transplantation*, 58, pp. 1275-1277 (1994); Baetge et al., *PNAS*, 83, pp. 5454-58 (1986). El vector de expresión pNUT puede modificarse de tal manera que la secuencia codificante de DHFR se sustituye por la secuencia codificante para G418 o la resistencia al fármaco higromicina. El promotor de SV40 dentro del vector de expresión pNUT también se puede sustituir por cualquier promotor de mamífero expresado constitutivamente adecuado, tales como los discutidos anteriormente.

Los expertos en la técnica reconocerán que también se pueden utilizar otros vectores de expresión comercialmente disponibles y adecuados (por ejemplo, familia pcDNA (Invitrogen), pBlast, pMono, pVitro, o pCpG-vitro (InvivoGen)). Los elementos principales que regulan la expresión se encuentran típicamente en el casete de expresión. Estos elementos incluyen el promotor, la región 5' no traducida (5' UTR) y la región 3' no traducida (3' UTR). Otros elementos de un vector de expresión adecuado pueden ser críticos para la integración del plásmido o la expresión, pero pueden no ser fácilmente aparentes. El experto en la materia será capaz de diseñar y construir vectores de expresión adecuados para uso en la invención reivindicada. La elección, diseño y/o construcción de un vector adecuado está dentro del nivel habitual de experiencia en la técnica.

Los genes y ADNc que codifican los receptores VEGF1, VEGF2, PDGF alfa, y PDGF beta han sido clonados y sus secuencias de nucleótidos publicada. (Acceso del GenBank U01134 y AF063658, NM 006206, BC032224). Otros genes que codifican las moléculas biológicamente activas útiles en esta invención que no están disponibles públicamente pueden obtenerse usando procedimientos de ADN recombinante estándar, tales como la amplificación PCR, selección genómica y de la biblioteca de ADNc con sondas de oligonucleótidos. Cualquiera de los genes conocidos que codifican para moléculas biológicamente activas pueden ser empleados en los métodos de esta invención.

La célula de elección es la línea celular ARPE-19, una línea de células epiteliales pigmentadas humana retinal continua que surge de forma espontánea. Sin embargo, los expertos en la técnica reconocerán que otras células adecuadas también se puede utilizar, incluyendo pero sin limitarse a las células CHO, células BHK, RPE (células primarias o células inmortalizadas). La elección de la célula depende de la aplicación prevista. Las células encapsuladas pueden ser elegidas para la secreción de una estructura de anticuerpo anti-angiogénico particular, o una construcción del receptor VEGF. También se pueden emplear células que sinteticen y secreten agonistas,

análogos, derivados o fragmentos de la construcción, que sean activos. Los expertos en la técnica reconocerán que otros tipos de células adecuadas también pueden ser diseñados genéticamente para secretar cualquiera de las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o constructos de receptor de VEGF descritos en el presente documento.

- 5 Para ser una línea celular de plataforma para un sistema de administración basado en células encapsuladas, la línea celular debe tener tantas de las siguientes características como sea posible: (1) las células deben ser resistentes en condiciones severas (las células encapsuladas deben ser funcionales en las cavidades del tejido avascular, tales como en el sistema nervioso central o el ojo, especialmente en el entorno intra-ocular); (2) las células deben ser capaces de ser modificadas genéticamente (los factores terapéuticos deseados tienen que ser modificados por ingeniería genética en las células); (3) las células deben tener una vida útil relativamente larga (las células deben producir suficientes progenies para ser depositadas, caracterizadas, diseñadas genéticamente, probadas que son seguras y fabricadas en lotes clínicos); (4) las células deben ser preferentemente de origen humano (lo cual incrementa la compatibilidad entre las células encapsuladas y el huésped); (5) las células deben exhibir una viabilidad mayor que 80% durante un periodo de más de un mes in vivo en el dispositivo (lo que asegura la administración a largo plazo); (6) las células encapsuladas deben suministrar una cantidad eficaz de un producto biológico útil (lo cual asegura la eficacia del tratamiento); (7) las células deben tener un nivel bajo de reacción inmune anfitrión (lo que asegura la longevidad del injerto); y (8) las células deben ser no tumorales (para proporcionar mayor seguridad al huésped, en caso de fuga del dispositivo).

20 La línea celular ARPE-19 (véase Dunn et al., 62 Exp. Eye Res. 155-69 (1996), Dunn et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2744-9 (1998), Finnemann et al., 94 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 12932-7 (1997), Handa et al., 66 Exp. Eye. 411-9 (1998), Holtkamp et al., 112 Clin. Exp. Immunol. 34-43 (1998), Maidji et al., 70 J. Virol. 8402-10 (1996); Patente de Estados Unidos No. 6.361.771) muestra todas las características de una célula de plataforma de éxito para un sistema de administración basado en células encapsuladas. La línea celular ARPE-19 está disponible en la American Type Culture Collection (ATCC número CRL-2302). Las células ARPE-19 son células normales de la retina del epitelio pigmentado (RPE) y expresan los marcadores específicos de células de la retina del epitelio pigmentario CRALBP y RPE-65. Las células ARPE-19 forman monocapas estables, las cuales exhiben polaridad morfológica y funcional.

25 Las células ARPE-19 modificadas por Ingeniería genética de la presente invención expresan uno o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas de la presente invención para producir una cantidad terapéutica de la estructura de anticuerpos anti-angiogénica y/o de la molécula anti-angiogénica. En algunas realizaciones, las células ARPE-19 modificadas por ingeniería genética son capaces de producir al menos 10.000 ng/día/10⁶ células. Preferiblemente, estas células son capaces de producir esta cantidad durante un período de al menos 3 meses.

35 En otras realizaciones, estas moléculas pueden introducirse en las células ARPE-19 utilizando un proceso de transfección iterativo. La transfección iterativa contiene al menos una transfección, dos transfecciones, tres transfecciones, o más transfecciones (por ejemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más) transfecciones. La línea celular de la presente invención puede producir entre 10.000 y 30.000 ng/día/10⁶ células, preferiblemente aproximadamente o al menos 15.000 ng/día/10⁶ células de uno o más de los agentes biológicos de las estructuras de anticuerpos y las proteínas de fusión del receptor (es decir, estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas) cuando la transfección iterativa consiste en una transfección. Alternativamente, la línea celular puede producir entre 30.000 y 50.000 ng/día/10⁶ células, preferiblemente aproximadamente o por lo menos 35.000 ng/día/10⁶ células de una o más de las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas cuando la transfección iterativa consiste en dos transfecciones. En otras realizaciones, la línea celular produce entre 50.000 y 75.000 ng/día/10⁶ células, preferiblemente aproximadamente o al menos 70.000 ng/día/10⁶ células de las una o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas cuando la transfección iterativa consiste en tres transfecciones. En algunas realizaciones, las mismas estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas pueden ser introducidas en las células por medio de tales transfecciones iterativas. Alternativamente, diferentes estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas se introducen en las células en cada transfección de la transfección iterativa.

50 Cuando se utilizan los dispositivos de la invención, preferiblemente entre 10² y 10⁸ células ARPE-19 modificadas por ingeniería genética, lo más preferiblemente 0,5-1,0 x 10⁶ o de 5x10² a 6x10⁵ células ARPE-19 que han sido diseñadas genéticamente para secretar una o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o constructos de receptor de VEGF o PDGF descritos en este documento, están encapsuladas en cada dispositivo. La dosificación puede controlarse implantando un número menor o mayor de cápsulas, preferiblemente entre 1 y 50 cápsulas por paciente. Los dispositivos oftálmicos descritos en este documento son capaces de suministrar entre aproximadamente 0,1 pg y 1000 µg de la estructura(s) de anticuerpos anti-angiogénica o constructos del receptor de VEGF o receptor de PDGF solubles) por ojo por paciente por día. En un ejemplo no limitante, la cantidad terapéutica es 500-50.000 ng de estado estacionario por ojo. En otro ejemplo, la cantidad terapéutica es al menos 10 µg/ml de estado estacionario por ojo. Por otra parte, las líneas celulares y los dispositivos de la presente invención son capaces de expresar esta cantidad terapéutica durante un período de al menos tres meses.

60

Las técnicas y procedimientos para el aislamiento de células o tejidos que producen un producto seleccionado son conocidos para los expertos en la técnica, o se pueden adaptar de procedimientos conocidos con no más que la experimentación de rutina.

5 Si las células a ser aisladas son células replicantes o líneas celulares adaptadas al crecimiento in vitro, es particularmente ventajoso para generar un banco de células de estas células. Una ventaja particular de un banco de células es que es una fuente de células preparadas a partir del mismo cultivo o lote de células. Es decir, todas las células se originaron de la misma fuente de las células y han estado expuestas a las mismas condiciones y tensiones. Por lo tanto, los viales pueden ser tratados como un cultivo homogéneo. En el contexto del trasplante, esto facilita en gran medida la producción de dispositivos idénticos o de sustitución. También permite protocolos de prueba simplificados, lo que asegura que las células implantadas están libres de retrovirus y similares. También puede permitir la supervisión en paralelo de vehículos in vivo e in vitro, permitiendo de este modo la investigación de efectos o factores únicos de residencia in vivo.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "individuo" o "receptor" o "huésped" se utilizan indistintamente para referirse a un sujeto animal o humano.

15 Una "molécula biológicamente activa" ("BAM") es una sustancia que es capaz de ejercer un efecto biológicamente útil sobre el cuerpo de un individuo en el que se implanta un dispositivo de la presente invención. Por ejemplo, las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas y las construcciones del receptor de VEGF descritas en este documento son ejemplos de BAMs.

20 Los términos "cápsula" y "dispositivo" y "vehículo" se utilizan indistintamente en la presente para referirse a los dispositivos ECT de la invención.

A menos que se especifique lo contrario, el término "células" significa células en cualquier forma, incluyendo pero no limitado a células retenidas en tejido, grupos de células, y células aisladas individualmente.

25 Tal como se usa en el presente documento una "cápsula biocompatible" o "dispositivo biocompatible" o "vehículo biocompatible" significa que la cápsula o el dispositivo o el vehículo, después de la implantación en un individuo, no provoca una respuesta del huésped perjudicial suficiente para resultar en el rechazo de la cápsula o para que sea inoperable, por ejemplo a través de la degradación.

30 Tal como se usa en el presente documento, una "cápsula inmunoaislante" o "cápsula inmunoprotectora" o "dispositivo inmunoaislante" o "dispositivo inmunoprotector" o "vehículo inmunoaislante" o "vehículo inmunoprotector" significan que la cápsula, tras la implantación en un individuo, separa favorablemente el contenido celular del dispositivo y minimiza los efectos nocivos del sistema inmunitario del huésped en las células dentro de su núcleo.

35 En la presente memoria "la expresión estable a largo plazo de una molécula biológicamente activa" significa la producción continua de una molécula biológicamente activa a un nivel suficiente para mantener su actividad biológica útil durante períodos mayores a un mes, preferiblemente mayores a tres meses y lo más preferiblemente superiores a seis meses. Los implantes de los dispositivos y el contenido del mismo son capaces de retener la funcionalidad durante más de tres meses in vivo y en muchos casos durante más de un año, y en algunos casos más de dos años o más.

Los términos "camisa" y "membrana semipermeable" se usan indistintamente en el presente documento.

40 La expresión "estructura interna" es un ejemplo de una "matriz" que se puede utilizar en los dispositivos descritos en este documento.

La naturaleza "semi-permeable" de la membrana de camisa que rodea el núcleo permite que las moléculas producidas por las células (por ejemplo, metabolitos, nutrientes y/o sustancias terapéuticas) se difundan desde el dispositivo en el tejido del ojo huésped circundante, pero es suficientemente impermeable para proteger las células en el núcleo del ataque inmunológico perjudicial por el huésped.

45 La exclusión de IgG del núcleo del vehículo no es la piedra de toque del inmunoaislamiento, ya que en la mayoría de los casos solo la IgG es insuficiente para producir la citólisis de las células o tejidos diana. Por lo tanto, para las cápsulas inmunoaislantes, se contemplan valores del punto de corte del peso molecular nominal (MWCO) de la camisa de hasta 1000 kD. Preferiblemente, el MWCO está entre 50-700 kD. Más preferiblemente, el MWCO está entre 70 y 300 kD. Véase, por ejemplo, el documento WO 92/19195. En una realización preferida, el MWCO es de 500 kD.

55 La presente invención también se refiere a dispositivos biocompatibles, opcionalmente inmunoaislantes y/o inmunoprotectores, para la entrega de una o más de las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o receptores de VEGF solubles descritos en este documento para el ojo. Tales dispositivos contienen un núcleo que contiene células vivas que producen o segregan la estructura anti-angiogénica de anticuerpos, el receptor de VEGF, o el receptor de PDGF y una camisa biocompatible que rodea el núcleo, en el que la camisa tiene un punto de corte de

peso molecular ("MWCO") que permite la difusión de la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o el receptor de VEGF en el ojo y en el sistema nervioso central, incluyendo el cerebro, el ventrículo y la médula espinal.

5 La invención también proporciona dispositivos biocompatibles e implantables y opcionalmente inmunoaislantes y/o inmunoprotectores, que contienen un núcleo con células que produce o segrega una o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas y una membrana semi-permeable que rodea las células, lo que permite la difusión de las una o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas a su través.

Tales dispositivos pueden incluir uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o la totalidad de las siguientes características adicionales:

- 10 a. el núcleo contiene aproximadamente $0,5-1,0 \times 10^6$ células ARPE-19;
- b. la longitud del dispositivo es aproximadamente 4 mm-11 mm;
- c. el diámetro interno del dispositivo está entre 0,9 mm-1,2 mm;
- d. los extremos del dispositivo se sellan utilizando metacrilato de metilo;
- e. la membrana semi-permeable tiene un tamaño medio de poro de aproximadamente 100 nm;
- 15 f. el punto de corte del peso molecular nominal (MWCO) de la membrana semi-permeable es 500 kD;
- g. la membrana semipermeable está entre 90-120 μm de espesor;
- h. el núcleo contiene una estructura interna, en la que la estructura comprende fibras de tereftalato de polietileno (PET) que comprende entre 40 y 85% del volumen interno del dispositivo;
- i. cualquier combinación(s) de los mismos.

20 Una variedad de cápsulas biocompatibles son adecuadas para la administración de moléculas según esta invención. Las cápsulas de polímeros biocompatibles útiles comprenden (a) un núcleo que contiene una célula o células, suspendidas en un medio líquido o inmobilizadas dentro de una matriz biocompatible, y (b) una camisa que rodea que comprende una membrana que no contiene células aisladas, que es biocompatible, y permite la difusión de la molécula biológicamente activa producida por las células en el ojo.

25 Muchas células transformadas o líneas celulares son ventajosamente aisladas dentro de una cápsula que tiene un núcleo líquido, que comprende, por ejemplo, un medio nutriente, y que contiene opcionalmente una fuente de factores adicionales para mantener la viabilidad y la función celular. El núcleo de los dispositivos de la invención puede funcionar como un depósito para los factores de crecimiento (por ejemplo, la prolactina, o factor de crecimiento tipo insulina 2) sustancias reguladoras del crecimiento, tales como el factor de crecimiento transformante β (TGF-beta) o la proteína del gen del retinoblastoma o potenciadores de transporte-nutrientes (por ejemplo, perfluorocarbonos, que pueden mejorar la concentración de oxígeno disuelto en el núcleo). Algunas de estas sustancias son también apropiadas para su inclusión en medios líquidos.

30 Además, cualquiera de los presentes dispositivos también puede ser utilizado como un depósito para el suministro controlado de fármacos o bioterapéuticos necesarios. En tales casos, el núcleo contiene una alta concentración del fármaco o del agente bioterapéutico (solo o en combinación con células o tejidos) seleccionado. Además, los vehículos satélite que contienen sustancias que preparan o crean un ambiente hospitalario en el área del cuerpo en la que se implanta el dispositivo de acuerdo con la invención también se pueden implantar en un receptor. En tales casos, los dispositivos que contienen las células inmunoaisladas se implantan en la región junto con los vehículos satélite liberando cantidades controladas de, por ejemplo, una sustancia que desmodula o inhibe una respuesta inflamatoria del receptor (por ejemplo, esteroides antiinflamatorios), o una sustancia que estimula el crecimiento interno de lechos capilares (por ejemplo, un factor angiogénico).

35 Alternativamente, el núcleo puede comprender una matriz biocompatible de un hidrogel u otro material biocompatible (por ejemplo, componentes de la matriz extracelular), que estabiliza la posición de las células. El término "hidrogel" en este documento se refiere a una red tridimensional de polímeros hidrófilos reticulados. La red está en la forma de un gel, sustancialmente compuesto de agua, preferiblemente los geles tienen más que un 90% de agua. Las composiciones que forman los hidrogeles se dividen en tres clases. La primera clase lleva una carga negativa neta (por ejemplo, alginato). La segunda clase lleva una carga positiva neta (por ejemplo, colágeno y laminina). Ejemplos de componentes de la matriz extracelular disponibles comercialmente incluyen Matrigel™ y Vitrogen™. La tercera clase es neutral neta en la carga (por ejemplo, óxido de polietileno altamente reticulado, o alcohol polivinílico).

50 Se puede emplear cualquier matriz o espaciador adecuado dentro del núcleo, incluyendo quitosán precipitado, polímeros sintéticos y mezclas de polímeros, microportadores y similares, dependiendo de las características de crecimiento de las células a encapsular.

Alternativamente, los dispositivos pueden tener una estructura interna. La estructura puede evitar que las células se agreguen y mejorar la distribución celular en el dispositivo. (Véase la publicación PCT N^o. WO 96/02646). La estructura define el microambiente de las células encapsuladas y mantiene las células bien distribuidas dentro del núcleo. La estructura interna óptima para un dispositivo en particular es altamente dependiente del tipo de célula que se utiliza. En ausencia de una estructura tal, las células adherentes se agregan para formar racimos.

Por ejemplo, la estructura interna puede ser un hilo o una malla. Los filamentos utilizados para formar un hilo o una estructura interna de malla están formados de cualquier material adecuado biocompatible, sustancialmente no degradable. (Véanse las Patentes de Estados Unidos Nos. 6.303.136 y 6.627.422).

Preferiblemente, la cápsula de esta invención será similar a las descritas por las solicitudes de patentes PCT internacionales WO 92/19195 o WO 95/05452; o las patentes de EE.UU. Nos. 5.639.275; 5.653.975; 4.892.538; 5.156.844; 5.283.187; o 5.550.050. Los materiales útiles en la formación de hilos o mallas tejidas incluyen cualesquiera polímeros biocompatibles que sean capaces de formarse en fibras tales como, por ejemplo, acrílico, poliéster, polietileno, polipropileno, poliacrilonitrilo, tereftalato de polietileno, nylon, poliamidas, poliuretanos, polibutiléster, o fibras naturales tales como algodón, seda, quitina o carbono. Cualquier polímero adecuado termoplástico, elastómero termoplástico, u otro material sintético o natural que tenga propiedades de formación de fibras se puede insertar en una membrana de fibra hueca prefabricada o en un cilindro hueco formado a partir de una lámina de membrana plana. Por ejemplo, los filamentos de seda, PET o nylon utilizados como materiales de sutura o en la fabricación de injertos vasculares son muy propicios para este tipo de aplicaciones. En otras realizaciones, se puede utilizar y tejer cinta de metal o alambre. Cada uno de estos materiales de filamentos tiene una superficie bien controlada y propiedades geométricas, puede ser producido en masa, y tiene una larga historia de usos en implantes. En ciertas realizaciones, los filamentos pueden ser "texturizados" para proporcionar superficies rugosas y "dispositivos de retención" en los que las proyecciones de células pueden adherirse. Los filamentos pueden estar recubiertos con moléculas de la matriz extracelular o estar tratados en su superficie (por ejemplo, por irradiación de plasma) para mejorar la adhesión celular a los filamentos.

En algunas realizaciones, los filamentos, preferiblemente organizados en una orientación unidireccional no aleatoria, se tuercen en haces para formar hilos de espesor variable y volumen hueco. El volumen hueco se define como los espacios existentes entre los filamentos. El volumen de los huecos en el hilo debe variar entre 20 y 95%, pero es preferiblemente entre 50 y 95%. En una realización preferida, la estructura interna está hecha de fibras de PET que llenan entre 40 y 85% el volumen interno de los dispositivos. El espacio hueco preferido entre los filamentos está entre 20 y 200 μm , suficiente para permitir que la estructura sea sembrada con células a lo largo de la longitud del hilo, y para permitir que las células se unan a los filamentos. El diámetro preferido de los filamentos que comprenden el hilo está entre 5 y 100 μm . Estos filamentos deben tener una resistencia mecánica suficiente para permitir la torsión en un haz para formar un hilo. La forma de la sección transversal del filamento puede variar, siendo preferidas las secciones transversales circulares, rectangulares, elípticas, triangulares y en forma de estrella.

Alternativamente, los filamentos o hilos pueden ser tejidos en una malla. La malla puede ser producida en una trenzadora usando vehículos, similares a bobinas, que contienen monofilamentos o multifilamentos, que sirven para alimentar ya sea el hilo o los filamentos en la malla durante el tejido. El número de vehículos es ajustable y se pueden enrollar con los mismos filamentos o una combinación de filamentos con diferentes composiciones y estructuras. El ángulo de la trenza, que se define por el número de pasadas, es controlado por la velocidad de rotación de los vehículos y por la velocidad de producción. En una realización, se utiliza un mandril para producir un tubo hueco de malla. En ciertas realizaciones, la trenza se construye como una única capa, en otras realizaciones se trata de una estructura de múltiples capas. La resistencia a la tracción de la trenza es la suma lineal de las resistencias a la tracción de los filamentos individuales.

En otras realizaciones, se construye una trenza tubular. La trenza puede ser insertada en una membrana de fibra hueca sobre la que se siembran las células. Alternativamente, las células pueden dejarse infiltrar en la pared del tubo de malla para maximizar el área superficial disponible para la fijación celular. Cuando se produce tal infiltración de células, la trenza sirve tanto como una matriz de estructura celular como como un soporte interno para el dispositivo. El aumento de la resistencia a la tracción para el dispositivo soportado por la trenza es significativamente mayor que en los enfoques alternativos.

Como se ha indicado, para los sitios de implante que no son inmunológicamente privilegiados, tales como los sitios periorbitales, y otras áreas fuera de la cámara anterior (acuoso) y la cámara posterior (vítreo), las cápsulas son preferiblemente inmunoislantes. Los componentes del material biocompatible pueden incluir una membrana semipermeable circundante y la estructura de soporte de las células internas. Las células transformadas se siembran preferiblemente sobre la estructura, que es encapsulada por la membrana de permeabilidad selectiva, que se describe anteriormente. Además, las estructuras de fibras unidas se pueden utilizar para la implantación de células. (Véase la Pat. de EE.UU. No. 5.512.600).

Los polímeros biodegradables incluyen, por ejemplo, los que comprenden poli (ácido láctico) PLA, poli (ácido láctico-coglicólico) PLGA, y poli PGA (ácido glicólico) y sus equivalentes. Las estructuras de espuma se han utilizado para proporcionar superficies sobre las que las células trasplantadas pueden adherirse (solicitud de patente internacional PCT N^o. Ser. 98/05304). Los tubos de malla tejida se han utilizado como injertos vasculares (solicitud de patente

Internacional PCT WO 99/52573). Además, el núcleo puede estar compuesto por una matriz inmovilizante formada a partir de un hidrogel, que estabiliza la posición de las células. Un hidrogel es una red 3-dimensional de polímeros hidrófilos reticulados en forma de un gel, sustancialmente compuesto de agua.

5 Varios polímeros y mezclas de polímeros se puede utilizar para fabricar la membrana semipermeable circundante, incluyendo poliacrilatos (incluyendo copolímeros acrílicos), polivinilidenos, copolímeros de cloruro de polivinilo, poliuretanos, poliestirenos, poliamidas, acetatos de celulosa, nitratos de celulosa, polisulfonas (incluyendo poliéter sulfonas), polifosfacenos, poliacrilonitrilos, poli (acrilonitrilo/cloruro de covinilo), así como derivados, copolímeros y mezclas de los mismos. Preferiblemente, la membrana semipermeable circundante es una membrana de fibra hueca semipermeable biocompatible. Tales membranas, y los métodos de hacerlas se describen en las patentes de
10 EE.UU. Nos. 5.284.761 y 5.158.881.

La membrana semipermeable circundante se forma a partir de una fibra hueca de poliéter sulfona, tal como la descrita por la patente de EE.UU. N°. 4.976.859 o la patente de EE.UU. N°. 4.968.733. Una alternativa de material de membrana semipermeable que rodea es la polisulfona.

15 La cápsula puede ser de cualquier configuración apropiada para mantener la actividad biológica y proporcionar acceso para la entrega del producto o función, incluyendo por ejemplo, forma cilíndrica, rectangular, en disco, en forma de parche, ovoide, estrellada, o esférica. Además, la cápsula puede estar enrollada o envuelta en una estructura similar a una malla o anidada. Si la cápsula se va a recuperar después de que se implante, las configuraciones que tienden a conducir a la migración de las cápsulas desde el sitio de implantación, tales como
20 cápsulas esféricas lo suficientemente pequeñas como para viajar en los vasos sanguíneos del huésped receptor, no se prefieren. Ciertas formas, tales como rectángulos, parches, discos, cilindros y láminas planas ofrecen una mayor integridad estructural y son preferibles cuando se desea la recuperación.

Preferiblemente, el dispositivo tiene una fijación de sujeción que ayuda a mantener la colocación del dispositivo durante el implante, y que ayuda a su recuperación. Una fijación de sujeción de este tipo puede tener cualquier forma adecuada que se adapte a asegurar la cápsula en su lugar. Por ejemplo, la sutura puede ser un bucle, un
25 disco, o una sutura. En algunas realizaciones, la fijación de sujeción tiene la forma de un ojal, por lo que la sutura se puede utilizar para asegurar la fijación de sujeción (y así el dispositivo) a la esclerótica, u otra estructura ocular adecuada. En otra realización, la fijación de sujeción es continua con la cápsula en un extremo, y forma una aguja de sutura pre-rosca en el otro extremo. En una realización preferida, la fijación de sujeción es un bucle de anclaje que está adaptado para el anclaje de la cápsula a una estructura ocular. La fijación de sujeción puede estar
30 construida de un metal con memoria de forma y/o cualquier otro material de calidad médica adecuada conocido en la técnica.

En una configuración de fibra hueca, la fibra tendrá un diámetro interior de menos de 2000 micrómetros, preferiblemente menos de 1200 micrómetros. También se contemplan dispositivos que tienen un diámetro exterior de menos de 300-600 micras. En una realización preferida, el diámetro interior está entre 0,9 mm y 1,2 mm. Para la
35 implantación en el ojo, en una configuración de fibra hueca la cápsula tendrá preferentemente entre 0,4 cm y 1,5 cm de longitud, más preferiblemente entre 0,4 y 1,0 cm de longitud. En una realización preferida, la longitud del dispositivo está entre 4 mm y 11 mm. Dispositivos más largos pueden ser acomodados en el ojo, sin embargo, puede ser necesaria una forma curvada o arqueada para una colocación segura y apropiada. La configuración de fibra hueca es preferida para la colocación intraocular.

40 Para la colocación periocular, se contempla ya sea una configuración de fibra hueca (con dimensiones sustancialmente como anteriormente) o una configuración de lámina plana. El límite superior contemplado para una lámina plana es de aproximadamente 5 mm x 5 mm -asumiendo una forma cuadrada. También se contemplan otras formas con aproximadamente la misma área de superficie.

Los microdispositivos fabricados para el suministro de la estructura de anticuerpos anti-angiogénica, VEGFR soluble
45 o PDGFR soluble pueden tener una longitud de entre 1 y 2,5 milímetros, con un diámetro interior de entre 300 y 500 micrómetros y un diámetro exterior de entre 450 y 700 micras. En tales dispositivos micronizados, puede ser utilizada una estructura interna que contiene entre 10 y 60 monofilamentos de PET. El punto de corte del peso molecular está en el intervalo de estos dispositivos micronizados está entre 100 y 2.000 kDa. Por el contrario, la difusión pasiva de un dextrano de 70 kDa está en el intervalo entre 100 y 2000 x 10⁻¹⁰ cm²/s. Aunque se pueda usar
50 cualquier material(s) de membrana adecuado descrito en este documento en estos dispositivos micronizados, dos materiales preferidos son la polietersulfona y/o la polisulfona. Por otra parte, pueden ser fabricados microdispositivos con y sin anclajes hechos de un material adecuado (por ejemplo, nitinol). Para una discusión completa de los dispositivos micronizados, véase el documento WO2007/078922.

La función de permeabilidad selectiva de la membrana contemplada para el uso en el suministro de estructuras de anticuerpos, constructos de VEGFR y PDGFR descritos en este documento ha sido fabricada por el proceso de
55 inversión de fase, conocido por los familiarizados con la técnica, para residir dentro de la piel interior de la membrana. El desarrollo de la función de permeabilidad selectiva de rechazar la piel en la superficie interior mejora la consistencia de fabricación de la estructura de poro y el control de las propiedades de rechazo a la vez que protege las propiedades de la membrana a lo largo de la fabricación aguas abajo del dispositivo de encapsulación.

La función de permeabilidad selectiva de la membrana descrita por esta invención se desarrolló para permitir el paso de los tamaños moleculares requeridos para la necesidad terapéutica; sin embargo, las características también se han optimizado para permitir que se libere el tamaño más grande necesario al tiempo que se restringe el paso en la cápsula de moléculas sólo ligeramente más grandes que el tamaño de la proteína previsto.

5 Debido a la naturaleza alogénica de la interacción entre las células usadas en la invención y el receptor huésped, la mayor preocupación de rechazo proviene del ataque mediado por el complejo de célula inmune del huésped directamente contra las células encapsuladas trasplantadas, en vez del complejo de ataque mediado por el complemento citolítico o por la interacción de la interacción del anticuerpo con el complemento. Mientras que las membranas utilizadas en esta invención están diseñadas para permitir el paso de moléculas de hasta el tamaño de la inmunoglobulina G, la membrana restringirá todavía el transporte de moléculas tales como Clq (aproximadamente 10 400 kDa), la molécula más grande necesaria para el ensamblaje del complejo del ataque celular. El diseño de la membrana utilizada en esta invención, por lo tanto, maximizará la tasa de intercambio de nutrientes y metabolitos con el huésped, dando apoyo a una viabilidad a largo plazo de las células trasplantadas en el huésped, lo que permite un suministro sustancial de las moléculas terapéuticas diana desde las células encapsuladas al huésped, al tiempo que se evita el reconocimiento del complemento de las células encapsuladas y el contacto directo de las células con el huésped.

La membrana abierta contemplada para el uso con las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas, las construcciones de VEGFR y PDGFR descritas en este documento tendrá un punto de corte de peso molecular nominal (MWCO) de un valor de hasta 1000 kD. Preferiblemente, el MWCO está entre 50 a 700 kD e idealmente aproximadamente 300 kD. En una realización preferida, el MWCO es 500 kD. El tamaño de poro nominal de la membrana contemplada tendrá un tamaño de poro nominal de aproximadamente 100 nm y, basado en una distribución de Gauss de los poros, los poros más grandes absolutos serían menor que 150 nm. La difusión pasiva de una molécula de dextrano del tamaño de 70 kDa está entre 100 y 2.000×10^{-10} cm^2/s , y preferiblemente el coeficiente de difusión de un dextrano de 70 kDa está más cerca de 2.000×10^{-10} cm^2/s . La membrana abierta usada con las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas y las construcciones VEGFR tendrá un valor de permeabilidad hidráulica superior a aproximadamente 100 $\text{ml}/\text{min}/\text{m}^2/\text{mmHg}$. Alternativamente, si no se utiliza una membrana muy abierta, se utilizará una membrana más "inmunoaislante" y/o "inmunoprotectora". Para una tal membrana inmunoaislante, la permeabilidad hidráulica estará típicamente en el intervalo de 0,4-170 $\text{ml}/\text{min}/\text{m}^2/\text{mmHg}$, por ejemplo, 0,5-100 $\text{ml}/\text{min}/\text{m}^2/\text{mmHg}$, preferentemente en el intervalo de 15 a 50 $\text{ml}/\text{min}/\text{m}^2/\text{mmHg}$. Usando los procedimientos de ensayo para determinar un solo rechazo de peso molecular reconocido por aquellos familiarizados con la técnica, el corte del peso molecular nominal de una membrana más "inmunoaislante" rechazará el 90% de albúmina bovina, mientras que el flujo por difusión de una molécula de dextrano de 70 kDa permanecerá aproximadamente en 2.000×10^{-10} cm^2/s . El coeficiente de transferencia de masa de glucosa de la cápsula, definido, medido y calculado como se describe por Dionne et al., ASAI Abstracts, p. 99 (1993), y Colton et al., The Kidney, eds., Brenner BM y Rector FC, pp. 2425-89 (1981) será mayor que 10^{-6} cm^2/s , preferiblemente mayor que 10^{-4} cm^2/s .

En una realización preferida, el tamaño medio de poro es de aproximadamente 100 nm. La región circundante o periférica (camisa), que rodea el núcleo de los dispositivos instantáneos puede ser de permeabilidad selectiva, biocompatible, y/o inmunoaislante. Se produce de tal manera que está libre de células aisladas, y rodea completamente (es decir, aísla) al núcleo, evitando de ese modo cualquier contacto entre las células en el núcleo y el cuerpo del receptor. Las membranas biocompatibles semipermeables de fibras huecas, y los métodos para prepararlas se describen en las patentes de EE.UU. Nos. 5.284.761 y 5.158.881 (Véase también, el documento WO 95/05452).

Por ejemplo, la camisa de la cápsula se puede formar a partir de una fibra hueca de poliéter sulfona, tal como las descritas en las patentes de EE.UU. Nos. 4.976.859 y 4.968.733, y 5.762.798.

45 Para tener permeabilidad selectiva, la camisa se forma de tal manera que tiene un intervalo de punto de corte del peso molecular ("MWCO") apropiado, tanto para el tipo como para la extensión de la reacción inmunológica prevista que se produzca después de que se implante el dispositivo y para el tamaño molecular de la sustancia más grande, cuyo paso dentro y fuera del dispositivo en el ojo es deseable. El tipo y alcance de los ataques inmunológicos que pueden ser montados por el receptor después de la implantación del dispositivo dependen en parte del tipo(s) de la fracción aislada dentro de éste y en parte de la identidad del receptor (es decir, cómo de cerca el receptor está genéticamente relacionado con la fuente de BAM). Cuando el tejido o las células implantadas son alogénicas para el receptor, el rechazo inmunológico puede proceder en gran medida a través del ataque mediado por las células mediante las células inmunes del receptor contra las células implantadas. Cuando el tejido o las células son xenogénicas para el receptor, el ataque molecular a través del ensamblaje del complejo del ataque del complemento citolítico del receptor puede predominar, así como la interacción de los anticuerpos con el complemento.

La camisa permite el paso de sustancias de hasta un tamaño predeterminado, pero evita el paso de sustancias más grandes. Más específicamente, la región circundante o periférica se produce de una manera tal que tiene poros o huecos de un intervalo predeterminado de tamaños, y, como resultado, el dispositivo es de permeabilidad selectiva. El punto de corte del peso molecular de la camisa que rodea debe ser lo suficientemente bajo para evitar el acceso de las sustancias necesarias para llevar a cabo ataques inmunológicos al núcleo, pero lo suficientemente alto para permitir la entrega de la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o el receptor de VEGF o receptor de PDGF al

receptor. Preferiblemente, cuando se utilizan estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas truncadas o receptores de VEGF o receptores de PDGF, el MWCO de la camisa biocompatible de los dispositivos de la presente invención es de aproximadamente 1 kD a aproximadamente 150 kD. Sin embargo, si se desea un suministro de una estructura de anticuerpos anti-angiogénica no truncada o receptor, debe ser utilizada una membrana abierta con un MWCO mayor que 200 kD.

Como se usa en este documento con respecto a la camisa del dispositivo, el término "biocompatible" se refiere colectivamente a tanto el dispositivo como a su contenido. Específicamente, se refiere a la capacidad del dispositivo implantado intacto y a su contenido de evitar los efectos perjudiciales de los diversos sistemas de protección del cuerpo y a permanecer funcional durante un período de tiempo significativo. En la presente memoria, la expresión "sistemas de protección" se refiere a los tipos de ataque inmunológico que se pueden montar por el sistema inmune de un individuo en el que se implanta el presente vehículo y a otros mecanismos de rechazo, tales como la respuesta fibrótica, respuesta a cuerpos extraños y otros tipos de respuesta inflamatoria que pueden ser inducidas por la presencia de un objeto extraño en el cuerpo de los individuos. Además de evitar las respuestas protectoras del sistema inmune o la respuesta fibrótica de un cuerpo extraño, el término "biocompatible", como se usa en este documento, también implica que los efectos citotóxicos o sistémicos indeseables específicos no están causados por el vehículo y sus contenidos tales como los que podrían interferir con el funcionamiento deseado del vehículo o de sus contenidos.

La superficie externa del dispositivo puede ser seleccionada o diseñada de tal manera que sea particularmente adecuada para la implantación en un sitio seleccionado. Por ejemplo, la superficie externa puede ser lisa, punteada o rugosa, dependiendo de si la adhesión de las células del tejido circundante es deseable. La forma o configuración también se pueden seleccionar o diseñar para que sea particularmente apropiada para el lugar de implantación escogido.

La biocompatibilidad de la región circundante o periférica (camisa) del dispositivo se produce por una combinación de factores. Importante para la biocompatibilidad y la funcionalidad continuada son la morfología del dispositivo, la hidrofobicidad y la ausencia de sustancias indeseables, ya sea en la superficie, o lixiviables del propio dispositivo. Por lo tanto, se evitan superficies de cepillo, pliegues, capas intermedias u otras formas o estructuras que provoquen una respuesta de cuerpo extraño. Además, los materiales formadores de dispositivos son suficientemente puros para asegurar que las sustancias no deseadas no se lixivian fuera de los propios materiales de dispositivos. Además, después de la preparación del dispositivo, se evita el tratamiento de la superficie externa del dispositivo con fluidos o materiales (por ejemplo, suero) que puedan adherirse o ser absorbidos por el dispositivo y posteriormente perjudiquen la biocompatibilidad del dispositivo.

En primer lugar, los materiales usados que forman la camisa de dispositivo son sustancias seleccionadas en base a su capacidad de ser compatibles y aceptados por los tejidos del receptor del dispositivo implantado. Se utilizan sustancias que no sean perjudiciales para el receptor o para las células aisladas. Las sustancias preferidas incluyen materiales poliméricos, es decir, polímeros termoplásticos. Sustancias poliméricas termoplásticas particularmente preferidas son las que son moderadamente hidrófobas, es decir, aquellas que tienen un parámetro de solubilidad como se define en Brandrup J., et al. *Polymer Handbook* 3ª Ed., John Wiley & Sons, NY (1989), entre 8 y 15, o más preferiblemente, entre 9 y 14 (julios/m^3)^{1/2}. Las sustancias poliméricas se eligen para que tengan un parámetro de solubilidad lo suficientemente bajo para que sean solubles en disolventes orgánicos y aún lo suficientemente alto para que se distribuyan para formar una membrana adecuada. Tales sustancias poliméricas deben estar sustancialmente libre de restos nucleófilos lábiles y ser altamente resistentes a los oxidantes y enzimas, incluso en ausencia de agentes estabilizantes. El período de residencia en vivo que se contempla para el vehículo particular, también debe tenerse en cuenta: las sustancias que se deben elegir son adecuadamente estables cuando se exponen a condiciones fisiológicas y tensiones. Muchos termoplásticos son conocidos que son lo suficientemente estables, incluso durante largos períodos de residencia in vivo, tales como períodos de más de uno o dos años.

La elección de los materiales utilizados para construir el dispositivo está determinada por una serie de factores como se describe en detalle en el documento de Dionne WO 92/19195. Brevemente, se pueden utilizar varios polímeros y mezclas de polímeros para la fabricación de la camisa de la cápsula. Las membranas poliméricas que forman el dispositivo y las superficies de crecimiento en su interior pueden incluir poliácridatos (incluyendo copolímeros acrílicos), polivinilidenos, copolímeros de cloruro de polivinilo, poliuretanos, poliestirenos, poliamidas, polimetilmetacrilato, polivinildifluoruro, poliolefinas, acetatos de celulosa, nitratos de celulosa, polisulfonas, polifosfacenos, poliácilonitrilos, poli (acrilonitrilo/cloruro de covinilo), así como derivados, copolímeros y mezclas de los mismos.

Una solución de moldeo de membrana preferida comprende una polisulfona, ya sea disuelta en el disolvente miscible en agua dimetilacetamida (DMACSO) o una polietersulfona disuelta en el disolvente miscible en agua butirólactona. Esta solución de moldeo puede comprender opcionalmente aditivos hidrófilos o hidrófobos que afectan a las características de permeabilidad de la membrana terminada. Un aditivo hidrófilo preferido para la polisulfona o polietersulfona es la polivinilpirrolidona (PVP). Otros polímeros adecuados comprenden poliácilonitrilo (PAN), polimetilmetacrilato (PMMA), polivinildifluoruro (PVDF), óxido de polietileno, poliolefinas (por ejemplo, poliisobutileno o polipropileno), poliácilonitrilo/cloruro de polivinilo (PAN/PVC), y/o derivados de celulosa (por ejemplo, acetato de

celulosa o butirato de celulosa). Disolventes compatibles miscibles en agua para estos y otros polímeros y copolímeros adecuados se encuentran en las enseñanzas de la patente de EE.UU. N° 3.615.024.

5 En segundo lugar, las sustancias utilizadas en la preparación de la camisa biocompatible del dispositivo están o bien libre de sustancias pirógenas lixiviables o nocivas de otra manera, irritantes o inmunogénicas, o bien están exhaustivamente purificadas para eliminar estas sustancias nocivas. A partir de entonces, y durante la fabricación y el mantenimiento del dispositivo antes de la implantación, se tiene gran cuidado para evitar la adulteración o contaminación del dispositivo o de la camisa con sustancias, lo que afectaría negativamente a su biocompatibilidad.

10 En tercer lugar, la configuración exterior del dispositivo, incluyendo su textura, se forma de tal manera que proporciona una interfaz óptima con el ojo del receptor después de la implantación. Ciertas geometrías de dispositivos también se han encontrado que inducen específicamente respuestas fibróticas a cuerpo extraño y deben evitarse. De este modo, los dispositivos no deben contener estructuras que tengan capas intermedias tales como superficies en cepillo o pliegues. En general, las superficies del vehículo opuestas o bordes, ya sea del mismo vehículo o adyacente deben estar separadas por al menos 1 mm, preferiblemente mayor que 2 mm y más preferiblemente mayor que 5 mm. Las realizaciones preferidas incluyen cilindros que tienen un diámetro exterior de entre aproximadamente 200 y 1600 μm y una longitud entre aproximadamente 0,4 y 1 mm. Preferiblemente, el núcleo de los dispositivos de la invención tiene un volumen de aproximadamente entre 2 μl y 20 μl . Sin embargo, los expertos en la técnica reconocerán que también es posible utilizar dispositivos "micronizados" que tienen un volumen de núcleo de menos de 0,5 μl (por ejemplo, aproximadamente 0,3 μl).

20 La camisa que rodea de los dispositivos biocompatibles puede incluir opcionalmente sustancias que disminuyen o disuaden la respuesta inflamatoria local al vehículo implantado y/o generan o fomentan un medio local apropiado para las células o tejidos implantados. Por ejemplo, podrían ser incluidos anticuerpos frente a uno o varios mediadores de la respuesta inmune. Anticuerpos potencialmente útiles disponibles tales como los anticuerpos contra el factor de necrosis tumoral de linfoquinas (TNF), y frente a los interferones (IFN) se pueden incluir en la solución de precursor de la matriz. Del mismo modo, un esteroide anti-inflamatorio puede ser incluido. Véase Christenson, L., et al., J. Biomed. Mat. Res., 23, pp. 705-718 (1989); Christenson, L., Ph.D. tesis, Universidad de Brown, 1989. Alternativamente, puede ser incluida una sustancia que estimule la angiogénesis (crecimiento interno de lechos capilares).

30 En algunas realizaciones, la camisa del presente dispositivo es inmunoaislante y/o inmunoprotectora. Es decir, protege a las células en el núcleo del dispositivo del sistema inmune del individuo en el que se implanta el dispositivo. Lo hace (1) mediante la prevención de que sustancias nocivas del cuerpo del individuo entren en el núcleo, (2) minimizando el contacto entre el individuo y materiales inflamatorios, antigénicos, o de otro modo perjudiciales que puedan estar presentes en el núcleo y (3), proporcionando una barrera espacial y física suficiente para evitar el contacto inmunológico entre el resto aislado y las porciones perjudiciales del sistema inmune del individuo.

35 En algunas realizaciones, la camisa externa puede ser o bien una membrana de ultrafiltración o una membrana microporosa. Los expertos en la técnica reconocerán que las membranas de ultrafiltración son aquellas que tienen un intervalo de tamaño de poro de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 nanómetros, mientras que una membrana microporosa tiene un intervalo de entre aproximadamente de 1 y aproximadamente 10 micras.

40 El espesor de esta barrera física puede variar, pero siempre será lo suficientemente grueso para evitar el contacto directo entre las células y/o las sustancias en cada lado de la barrera. El espesor de esta región oscila generalmente entre 5 y 200 micras; se prefieren espesores de 10 a 100 micras, y espesores de 20 a 50 o de 20 a 75 micras son particularmente preferidos. En una realización preferida, la membrana semi-permeable tiene entre 90 y 120 μm de espesor. Los tipos de ataque inmunológico que pueden evitarse o minimizarse mediante el uso del presente dispositivo incluyen ataque por macrófagos, neutrófilos, respuestas inmunes celulares (por ejemplo, células asesinas naturales y citólisis mediada por células T dependiente de anticuerpos (ADCC)), y la respuesta humoral (por ejemplo, citólisis mediada por el complemento dependiente de anticuerpos).

50 La camisa de la cápsula puede fabricarse a partir de varios polímeros y mezclas de polímeros incluyendo poliácridatos (incluyendo copolímeros acrílicos), polivinilidenos, copolímeros de cloruro de polivinilo, poliuretanos, poliestirenos, poliamidas, acetatos de celulosa, nitratos de celulosa, polisulfonas (incluyendo poliéter sulfonas), polifosfacenos, poliácridonitrilos, poli(acridonitrilo/cloruro de covinilo), así como derivados, copolímeros y mezclas de los mismos. Las cápsulas fabricadas a partir de tales materiales se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. Nos. 5.284.761 y 5.158.881. Cápsulas formadas a partir de una fibra de poliéter sulfona (PES), tales como las descritas en las patentes de EE.UU. Nos. 4.976.859 y 4.968.733, también se puede utilizar.

55 Dependiendo de la morfología de la superficie exterior, las cápsulas se han clasificado como Tipo 1 (T1), Tipo 2 (T2), Tipo 1/2 (T1/2), o Tipo 4 (T4). Se describen dichas membranas, por ejemplo, en Lacy et al., "Maintenance of Normoglycemia in Diabetic Mice by Subcutaneous Xenografts of Encapsulated Islets", Science, 254, pp. 1782-84 (1991), Dionne et al., documento WO 92/19195 y Baetge, documento WO 95/05452. Se prefiere una morfología de la superficie exterior lisa.

Los expertos en la técnica reconocerán que las camisas de las cápsulas con membranas inmunoaislantes con permeabilidad selectiva son preferibles para los sitios que no son inmunológicamente privilegiados. En contraste, las membranas microporosas o membranas de permeabilidad selectiva pueden ser adecuadas para los sitios privilegiados inmunológicamente. Para la implantación en los sitios privilegiados inmunológicamente, se prefieren las cápsulas hechas a partir de las membranas PES o PS.

Cualquier método adecuado de sellado de las cápsulas conocido en la técnica puede ser utilizado, incluyendo el empleo de adhesivos de polímero y/o engarce, anudado y sellado por calor. Además, cualquier método adecuado de sellado en "seco" también se puede utilizar. En tales métodos, se proporciona un ajuste sustancialmente no poroso a través del cual se introduce la solución que contiene las células. Después del llenado, la cápsula se sella. Tales métodos se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 5.653.688; 5.713.887; 5.738.673; 6.653.687; 5.932.460; y 6.123.700. En un método preferido, los extremos del dispositivo se sellan utilizando metacrilato de metilo.

De acuerdo con los métodos de esta invención, otras moléculas pueden ser co-suministradas además de las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o los receptores de VEGF descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser preferible administrar un factor(s) trófico con un factor anti-angiogénico.

La co-administración se puede lograr de diversas maneras. En este ejemplo, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos requieren construcciones que codifican las secuencias de cadena ligera y pesada. En primer lugar, las células pueden ser transfectadas con construcciones separadas que contienen los genes que codifican las moléculas descritas. En segundo lugar, las células pueden ser transfectadas con una única construcción que contenga dos o más genes, así como los elementos de control necesarios. Tercero, dos o más líneas celulares modificadas por ingeniería separadamente pueden ser co-encapsuladas o más de un dispositivo puede ser implantado en el sitio de interés.

Para algunas indicaciones, puede ser preferible para suministrar los BAM a dos sitios diferentes en el ojo concurrentemente. Por ejemplo, puede ser deseable suministrar un factor neurotrófico al vítreo para suministrar a la retina neural (células ganglionares al RPE) y para suministrar un factor anti-angiogénico (tal como una o más de las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o los receptores de VEGF de la invención) a través del espacio sub-Tenon para abastecer a la vasculatura coroidea.

Esta invención también contempla el uso de diferentes tipos de células durante el curso del régimen de tratamiento. Por ejemplo, un paciente puede ser implantado con un dispositivo de cápsula que contiene un primer tipo celular (por ejemplo, células BHK). Si después de un tiempo, el paciente desarrolla una respuesta inmune a ese tipo de célula, la cápsula puede ser recuperada, o explantada, y una segunda cápsula puede ser implantada con un segundo tipo celular (por ejemplo, células CHO). En esta manera, la provisión continua de la molécula terapéutica es posible, incluso si el paciente desarrolla una respuesta inmune a uno de los tipos de células encapsuladas.

Los métodos y dispositivos de esta invención están destinados para su uso en un huésped primate, preferiblemente un ser humano, receptor, paciente, sujeto o individuo. Un número de diferentes lugares de implantación oculares se contemplan para los dispositivos y métodos de esta invención. Los sitios de implantación adecuados incluyen, pero no se limitan a, los humores acuoso y vítreo del ojo, el espacio periocular, la cámara anterior, y/o la cápsula subtenoniana. Dentro del cuerpo, los sitios de implantación pueden incluir la región subcutánea, intraperitoneal, o dentro del SNC. Además, el implante puede estar dirigido a la administración localizada en las lesiones, o cerca de éstas, que requieren la terapia biológica deseada. Ejemplo de tales sitios de enfermedad pueden sea articulaciones inflamadas, lesiones del cerebro y del SNC, sitios de tumores benignos o malignos. El acceso por el dispositivo al sistema circulatorio puede extender aún más la gama de posibles sitios de enfermedad en el cuerpo a órganos y tejidos afectados distalmente.

El tipo y grado de respuesta inmunológica por el receptor frente al dispositivo implantado se verá influido por la relación del receptor con las células aisladas dentro del núcleo. Por ejemplo, si núcleo contiene células singénicas, éstas no causarán una reacción inmunológica vigorosa, a menos que el receptor sufra de una autoinmunidad con respecto a la célula o tejido tipo particular dentro del dispositivo. Células o tejidos singénicos rara vez están disponibles.

En muchos casos, pueden estar disponibles células o tejidos alogénicos o xenogénicos (es decir, de donantes de la misma especie que el posible receptor o de una especie diferente). El uso de dispositivos inmunoaislantes permite la implantación de células o tejidos alogénicos o xenogénicos, sin una necesidad concomitante de inmunosuprimir al receptor. El uso de cápsulas inmunoaislantes también permite el uso de células no coincidentes (alógrafos). Por lo tanto, el presente dispositivo hace que sea posible tratar muchos más individuos de los que se pueden tratar por técnicas de trasplante convencionales.

Se espera que el tipo y el vigor de la respuesta inmune frente al tejido xenoinjertado difieran de la respuesta encontrada cuando el tejido singénico o alogénico se implanta en el receptor. Este rechazo puede proceder principalmente por el ataque mediado por células o mediado por el complemento. La exclusión de IgG del núcleo del vehículo no es la piedra de toque de la inmunoprotección, porque en la mayoría de los casos solo la IgG es

insuficiente para producir la citólisis de las células o tejidos diana. Usando dispositivos inmunoaislantes es posible suministrar productos de alto peso molecular necesarios o proporcionar funciones metabólicas que pertenecen a sustancias de alto peso molecular, a condición de que las sustancias críticas necesarias para la mediación del ataque inmunológico se excluyan de la cápsula inmunoaislante. Estas sustancias pueden comprender el componente del complejo del ataque del complemento Clq, o pueden comprender células fagocíticas o citotóxicas. El uso de cápsulas inmunoaislantes proporciona una barrera protectora entre estas sustancias perjudiciales y las células aisladas.

Aunque los dispositivos de la presente invención son macrocápsulas, los expertos en la técnica reconocerán que las microcápsulas, tales como, por ejemplo las descritas en Rha, Lim y Sun también pueden ser utilizadas. (Véase, Rha, C. K. et al, Patente de EE.UU. No. 4.744.933; Methods in Enzymology 137, pp. 575-579 (1988); Patente de EE.UU. nº 4.652.833; Patente de EE.UU. nº 4.409.331). En general, las microcápsulas se diferencian de las macrocápsulas por (1) la exclusión completa de las células de la capa externa del dispositivo, y (2) el espesor de la capa exterior del dispositivo. Típicamente, las microcápsulas tienen un volumen del orden de 1 μ l y contienen menos de 10^4 células. Más específicamente, la microencapsulación encapsula aproximadamente 500-50.000 células, en general, por cápsula.

Las cápsulas con un MWCO menor se pueden utilizar para prevenir la interacción de las moléculas del sistema inmune del paciente con las células encapsuladas.

Cualquiera de los dispositivos usados de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento debe proporcionar, en al menos una dimensión, una proximidad suficientemente cercana de cualquier célula aislada en el núcleo a los tejidos que rodean el ojo del receptor con el fin de mantener la viabilidad y la función de las células aisladas. Sin embargo, las limitaciones de difusión de los materiales utilizados que forman el dispositivo no en todos los casos únicamente prescriben sus límites configuracionales. Ciertos aditivos se pueden usar que alteran o mejoran las propiedades difusionales, o propiedades nutricionales o de transporte de oxígeno, del vehículo básico. Por ejemplo, el medio interno del núcleo se puede complementar con perfluorocarbonos saturados de oxígeno, reduciendo así las necesidades de contacto inmediato con el oxígeno transportado por la sangre. Esto permitirá que las células o los tejidos aislados permanezcan viables mientras, por ejemplo, un gradiente de angiotensina se libera desde el vehículo a los tejidos circundantes, estimulando el crecimiento interno de los capilares. Referencias y métodos para la utilización de perfluorocarbonos son dados en Faithful, N. S. Anaesthesia, 42, pp. 234-242 (1987) y NASA Tech Briefs MSC-21480, U.S. Govt Printing Office, Washington, DC 20402. Alternativamente, para las líneas de células clonales, tales como las células PC12, las secuencias de hemoglobina modificadas por ingeniería genética se pueden introducir en las líneas de células para producir un almacenamiento de oxígeno superior. Véase NPO-17517 NASA Tech Briefs, 15, p. 54.

Las células encapsuladas pueden además ser cebadas para una mayor secreción por el control del medio ambiente y la suplementación de macronutrientes y de micronutrientes. Es bien conocido en el campo del desarrollo de aguas arriba de las células recombinantes que la optimización de los medios de cultivo, el pH y la temperatura pueden tener profundos efectos en el crecimiento celular, la densidad y la producción de proteína recombinante. Las células y los dispositivos de ECT cebados de tal manera pueden aumentar la productividad tras la implantación en el huésped, lo que permite un fenotipo de productividad mejorada prolongado que puede ser útil para la terapia. Como ejemplos, tales compuestos de nutrientes podrían ser, pero no se limitan a Tris, HEPES, glucosa, sacarosa, fosfolípidos, colesterol, ácido ascórbico, magnesio, sodio, vitaminas, potasio, y calcio, medios condicionados celulares, suero de ternera fetal, albúmina, lecitina, esfingomielina, lipoproteínas, HDL, LDL, poliaminas, etanolaminas, fibronectina, transferina, laminina, toxinas del cólera, hidrocortisona y otros esteroides, prostaglandinas, insulina, EGF, FGF2 y otros factores de crecimiento, dexametasona, beta-mercaptoetanol y otros agentes reductores, y selenio. Además, se pueden utilizar medios pre-formulados de proveedores comerciales de medios tales como Biowhittaker, Gibco/Invitrogen, Hyclone, JRH, Expression Systems, Sigma, PAA e Irvine Scientific.

El espesor de la camisa de dispositivo debe ser suficiente para prevenir una respuesta inmune por el paciente frente a la presencia de los dispositivos. Para ello, los dispositivos tienen preferiblemente un espesor mínimo de 1 μ m o más y están libres de las células.

Además, también se pueden incorporar en los dispositivos elementos estructurales de refuerzo. Por ejemplo, estos elementos estructurales se pueden hacer de una manera tal que sean impermeables y que estén configurados apropiadamente para permitir la inmovilización o la sutura del dispositivo a los tejidos del ojo del receptor. En ciertas circunstancias, estos elementos pueden actuar para sellar firmemente la camisa (por ejemplo, en los extremos del cilindro), completando de esta manera el aislamiento de los materiales del núcleo (por ejemplo, un clip de termoplástico moldeado). En muchas realizaciones, es deseable que estos elementos estructurales no deban ocluir un área significativa de la camisa de permeabilidad selectiva.

El dispositivo de la presente invención tiene un tamaño suficiente y una durabilidad para una recuperación completa después de la implantación. Un dispositivo preferido de la presente invención tiene un núcleo de un volumen de aproximadamente 1-3 μ l. La geometría interna de los dispositivos micronizados tiene un volumen de aproximadamente 0,05-0,1 μ l.

Junto con las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas y/o los receptores de VEGF solubles descritos en este documento, al menos un BAM adicional también se puede suministrar desde el dispositivo al ojo. Por ejemplo, el al menos un BAM adicional puede ser proporcionado a partir de una fuente celular o no celular. Cuando se proporciona el al menos un BAM adicional de una fuente no celular, el BAM(s) adicional puede estar encapsulado, dispersado dentro, o unido a uno o más componentes del sistema de células incluyendo, pero no limitado a: (a) sellante; (B) estructura; (C) membrana de la camisa; (D) anclaje de fijación; y/o (e) medios del núcleo. En tal realización, el co-

5 suministro de BAM a partir de una fuente no celular puede ocurrir a partir del mismo dispositivo que el BAM de la fuente celular.

Alternativamente, pueden ser utilizados dos o más sistemas de células encapsuladas. Por ejemplo, la al menos una molécula biológicamente activa adicional puede ser un ácido nucleico, un fragmento de ácido nucleico, un péptido, un polipéptido, un peptidomimético, un carbohidrato, un lípido, una molécula orgánica, una molécula inorgánica, un agente terapéutico, o cualquier combinaciones de los mismos. En concreto, los agentes terapéuticos pueden ser un fármaco anti-angiogénico, un fármaco anti-inflamatorio esteroideo y no esteroideo, un fármaco anti-mitótico, un fármaco anti-tumor, un medicamento anti-parasitario, un reductor de la PIO, un fármaco de péptido, y/o cualquier otro tipo de fármacos de moléculas biológicamente activas aprobados para su uso comercial.

10 15

Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, cualquier polímero no degradables o biodegradables, hidrogeles, mejoradores de la solubilidad, moléculas hidrófobas, proteínas, sales, u otros agentes complejantes aprobados para formulaciones.

Las dosis no celulares se pueden variar mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, tales como variando la concentración del agente terapéutico, y/o el número de dispositivos por ojo, y/o modificando la composición del excipiente de encapsulación. La dosis celular puede variarse cambiando (1) el número de células por dispositivo, (2) el número de dispositivos por ojo, y/o (3) el nivel de producción de BAM por célula. La producción celular se puede variar cambiando, por ejemplo, el número de copias del gen para BAM en la célula transducida, o la eficiencia de la expresión de conducción promotor de BAM. Las dosis adecuadas de fuentes celulares pueden variar de aproximadamente 1 pg a aproximadamente 1000 mg por día.

20 25

La presente invención también se refiere a métodos para la fabricación de los dispositivos macrocapsulares descritos en este documento. Los dispositivos pueden estar formados por cualquier método adecuado conocido en la técnica. (Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 6.361.771; 5.639.275; 5.653.975; 4.892.538; 5.156.844; 5.283.138; y 5.550.050).

Las membranas utilizadas también se pueden adaptar para controlar la difusión de las moléculas, tales como la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o el receptor de VEGF soluble, en función de su peso molecular. (Véase Lysaght et al., 56 J. Cell Biochem. 196 (1996), Colton, 14 Trends Biotechnol. 158 (1996)). Usando técnicas de encapsulación, las células pueden ser trasplantadas en un huésped sin rechazo inmunitario, ya sea con o sin el uso de fármacos inmunosupresores. La cápsula puede estar hecha de un material biocompatible que, después de la implantación en un huésped, no provoca una respuesta del huésped perjudicial suficiente para resultar en el rechazo de la cápsula o para que sea inoperable, por ejemplo a través de la degradación. El material biocompatible es relativamente impermeable a moléculas grandes, tales como componentes del sistema inmunitario del huésped, pero es permeable a moléculas pequeñas, tales como insulina, factores de crecimiento y nutrientes, permitiendo al mismo tiempo que los desechos metabólicos sean eliminados. Una variedad de materiales biocompatibles son adecuados para el suministro de factores de crecimiento mediante la composición de la invención. Se conocen numerosos materiales biocompatibles, que tienen diversas morfologías de superficie externa y otras características mecánicas y estructurales.

30 35 40

Si se desea un dispositivo con una camisa de membrana termoplástica o polímero, el intervalo del tamaño de poro y la distribución pueden determinarse mediante la variación del contenido de sólidos de la solución del material precursor (la solución de moldeo), la composición química del disolvente miscible en agua, o incluyendo, opcionalmente, un aditivo hidrófilo o hidrófobo a la solución de colada, como se enseña en la patente de los Estados Unidos. N° 3.615.024. El tamaño de poro también se puede ajustar mediante la variación de la hidrofobicidad del coagulante y/o del baño.

45

Típicamente, la solución de la colada comprenderá un disolvente orgánico polar que contiene un polímero o copolímero disuelto, insoluble en agua. Este polímero o copolímero precipita tras el contacto con una fase acuosa miscible en disolvente, formando una membrana de permeabilidad selectiva en el lugar de la interfaz. El tamaño de los poros en la membrana depende de la velocidad de difusión de la fase acuosa en la fase de disolvente; los aditivos hidrófilos o hidrófobos afectan el tamaño de poro mediante la alteración de esta velocidad de difusión. A medida que la fase acuosa se difunde más lejos en el disolvente, el resto del polímero o el copolímero se precipita para formar un soporte trabecular, que confiere resistencia mecánica al dispositivo acabado.

50 55

La superficie externa del dispositivo se determina de manera similar por las condiciones en las que se precipita el polímero o el copolímero disuelto (es decir, expuesto al aire, lo que genera una piel exterior abierta, trabecular o tipo esponja, sumergido en un baño de precipitación acuosa, lo que da como resultado una bicapa de membrana de

permeabilidad selectiva suave, o expuesto al aire saturado con vapor de agua, lo que da como resultado una estructura intermedia).

5 La textura de la superficie del dispositivo depende en parte de si la boquilla de extrusión se coloca por encima, o se sumerge en el baño: si la boquilla se coloca por encima de la superficie del baño se formará una piel exterior rugosa, mientras que si la boquilla es sumergida en el baño se forma una superficie externa lisa.

La matriz o membrana circundante o periférica puede ser preformada, rellena de los materiales que formarán el núcleo (por ejemplo, usando una jeringa), y posteriormente ser sellada de tal manera que los materiales del núcleo estén completamente encerrados. El dispositivo puede entonces ser expuesto a condiciones que den lugar a la formación de una matriz de núcleo si un material precursor de la matriz está presente en el núcleo.

10 Los dispositivos de la invención pueden proporcionarse para la implantación de diversos tipos de células o tejidos, incluyendo, células o tejidos diferenciados completamente, dependientes del anclaje, fetales o neonatales, o transformados, independientes del anclaje. Se preparan las células que se aíslan, ya sea de un donante (es decir, células o tejidos primarios, incluyendo células o tejidos adultos, neonatales, y fetales) o de células que se replican in vitro (es decir, células inmortalizadas o líneas celulares, incluyendo células modificadas genéticamente). En todos
15 los casos, se prepara una cantidad suficiente de células que producen niveles eficaces del producto necesario o para el suministro de un nivel efectivo de la función metabólica necesaria, en general, en condiciones estériles, y se mantiene apropiadamente (por ejemplo, en una solución salina equilibrada, tal como las sales de Hank, o en un medio de nutrientes, tal como el F12 de Ham) antes del aislamiento.

20 Los dispositivos de ECT de la invención tienen una forma que tiende a reducir la distancia entre el centro del dispositivo y la parte más cercana de la camisa con el fin de permitir un fácil acceso de los nutrientes por parte del paciente en la célula o la entrada de las proteínas del paciente en la célula para que se actúe sobre la célula para proporcionar una función metabólica. A este respecto, se prefiere una forma no esférica, tal como un cilindro.

25 Cuatro factores importantes que influyen en el número de células o la cantidad de tejido que se coloca en el núcleo del dispositivo (es decir, densidad de carga) de la presente invención son: (1) el tamaño del dispositivo y la geometría; (2) la actividad mitótica dentro del dispositivo; (3) los requisitos de viscosidad para la preparación del núcleo y/o la carga; y (4) el ensayo antes de la implantación y los requisitos de calificación.

30 Con respecto al primero de estos factores, (tamaño del dispositivo y geometría), la difusión de los nutrientes críticos y las necesidades metabólicas en las células, así como la difusión de metabolitos fuera de la célula son críticos para la viabilidad continuada de las células. En el caso de las células del EPR, tales como las células ARPE-19, las células vecinas son capaces de fagocitar a las células que mueren y utilizar los residuos como fuente de energía.

Entre los requisitos metabólicos conocidos de la difusión de sustancias en el dispositivo está la necesidad de oxígeno. Los requisitos de oxígeno de las células específicas deben determinarse para la célula de elección. Véanse los métodos y referencias para la determinación del metabolismo del oxígeno que se dan en Wilson D. F. y col., J. Biol. Chem., 263, pp. 2712-2718, (1988).

35 Con respecto al segundo factor (división celular), si se espera que las células seleccionadas se van a dividir activamente mientras están en el dispositivo, entonces, van a seguir dividiéndose hasta que llenen el espacio disponible, o hasta que fenómenos tales como la inhibición por contacto límite la división más. Para la replicación de las células, la geometría y el tamaño del dispositivo se eligen de manera que el llenado completo del núcleo del dispositivo no dará lugar a la privación de nutrientes críticos debido a limitaciones difusionales.

40 Con respecto al tercer factor (viscosidad de los materiales de núcleo), pueden ser viables células en densidades de ocupación de hasta un 70% del volumen del dispositivo, pero las soluciones de células en este rango de concentraciones tendrán una viscosidad considerable. La introducción de células en una solución muy viscosa en el dispositivo podría ser prohibitivamente difícil. En general, para ambos dos estrategias de paso y de coextrusión, las densidades de carga de células mayores que 30% rara vez serán útiles, y en general las densidades de carga
45 óptimas serán del 20% y por debajo. Por ejemplo, para los fragmentos de tejidos, es importante, con el fin de preservar la viabilidad de las células interiores, observar las mismas pautas generales que anteriormente y los fragmentos de tejido no deben exceder las 250 micras de diámetro teniendo las células interiores menos de 15, preferiblemente menos de 10 células entre ellas y la superficie difusional más cercana.

50 Por último, con respecto al cuarto de los factores (requisitos de preimplantación y de ensayo), en muchos casos, se requerirá una cierta cantidad de tiempo entre la preparación del dispositivo y la implantación. Por ejemplo, puede ser importante calificar el dispositivo en términos de su actividad biológica. Así, en el caso de células mitóticamente activas, la densidad de carga preferida también cuenta con el número de células que debe estar presente con el fin de realizar el ensayo de calificación.

55 En la mayoría de los casos, antes de la implantación in vivo, será importante utilizar ensayos in vitro para establecer la eficacia de BAM (por ejemplo, el estructura del anticuerpo anti-angiogénica o el receptor de VEGF o el receptor de PDGF) dentro del dispositivo. Los dispositivos pueden ser construidos y analizados utilizando sistemas modelo con el fin de permitir la determinación de la eficacia del vehículo en una base por volumen celular o unitario.

Después de estas pautas para la carga de los dispositivos y para la determinación de la eficacia del dispositivo, el tamaño real del dispositivo para la implantación será determinado a continuación por la cantidad de actividad biológica requerida para la aplicación particular. El número de dispositivos y el tamaño del dispositivo deben ser suficientes para producir un efecto terapéutico tras la implantación y se determina por la cantidad de actividad biológica requerida para la aplicación particular. En el caso de células secretoras que liberan sustancias terapéuticas, las consideraciones de dosificación estándar y los criterios conocidos en la técnica se pueden utilizar para determinar la cantidad de sustancia de secreción requerida. Los factores a ser considerados incluyen el tamaño y el peso del receptor; la productividad o el nivel funcional de las células; y, en su caso, la productividad normal o actividad metabólica del órgano o tejido cuya función está siendo reemplazada o aumentada. También es importante tener en cuenta que una fracción de las células puede no sobrevivir a los procedimientos de inmunoislamiento y de implantación. Por otra parte, si el receptor tiene una condición preexistente que puede interferir con la eficacia del implante, esto también debe ser considerado. Pueden ser fácilmente fabricados dispositivos de la presente invención que contengan muchos miles de células. Por ejemplo, los dispositivos clínicos oftálmicos actuales contienen entre 200.000 y 750.000 células, mientras que los dispositivos micronizados contendrían entre 10.000 y 100.000 células. Otros dispositivos a gran escala pueden contener entre 1.000.000 y 100.000.000 células.

La terapia con células encapsuladas se basa en el concepto del aislamiento de células del sistema inmune del huésped receptor mediante el rodeo de las células con un material biocompatible semipermeable antes de la implantación dentro del huésped. Por ejemplo, la invención incluye un dispositivo en el que células ARPE-19 modificadas por ingeniería genética se encapsulan en una cápsula inmunoaislante, que, después de la implantación en un huésped receptor, minimiza los efectos deletéreos del sistema inmune del huésped sobre las células ARPE-19 en el núcleo del dispositivo. Las células ARPE-19 se inmunoaislan desde el huésped incluyéndolas dentro de cápsulas poliméricas implantables formadas por una membrana microporosa. Este enfoque evita el contacto célula a célula entre el huésped y los tejidos implantados, eliminando de este modo el reconocimiento de antígenos a través de la presentación directa.

Cualquiera de las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o receptores de VEGF o receptores de PDGF descritos en este documento (solos o en cualquier combinación) puede ser entregado intraocularmente (por ejemplo, en la cámara anterior y la cavidad vítrea), periocularmente (por ejemplo, dentro o debajo de la cápsula de Tenon), o ambos. Los dispositivos de la invención también se pueden utilizar para proporcionar la liberación controlada y sostenida de las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o receptores para el tratamiento de diversos trastornos oftálmicos, enfermedades oftálmicas, y/o otras enfermedades que tienen efectos oculares.

Se contempla el suministro intraocular (preferiblemente en el vítreo) u ocular (preferiblemente en el espacio o región de la sub-Tenon) de un factor anti-angiogénico, tal como cualquiera de las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o receptores de VEGF solubles descritos en el presente documento, en un intervalo de dosificación de 0,1 pg y 1000 µg (por ejemplo, entre 0,1 pg y 500 µg; entre 0,1 pg y 250 µg; entre 0,1 pg y 100 µg; entre 0,1 pg y 50 µg; entre 0,1 pg y 25 µg; entre 0,1 pg y 10 µg; entre 0,1 pg y 5 µg; entre 0,1 pg y 100 ng; entre 0,1 pg y 50 ng; entre 0,1 pg y 25 ng; entre 0,1 pg y 10 ng, o entre 0,1 pg y 5 ng) por ojo por paciente por día. En un ejemplo no limitante, la cantidad terapéutica es al menos 0,5-50 µg/ml estado estacionario en el ojo. La cantidades terapéuticas adecuadas pueden incluir, por ejemplo, 0,5 µg, 0,6 µg, 0,7 µg, 0,8 µg, 0,9 µg, 1 µg, 2 µg, 3 µg, 4 µg, 5 µg, 6 µg, 7 µg, 8 µg, 9 µg, 10 µg, 11 µg, 12 µg, 13 µg, 14 µg, 15 µg, 16 µg, 17 µg, 18 µg, 19 µg, 20 µg, 21 µg, 22 µg, 23 µg, 24 µg, 25 µg, 26 µg, 27 µg, 28 µg, 29 µg, 30 µg, 31 µg, 32 µg, 33 µg, 34 µg, 35 µg, 36 µg, 37 µg, 38 µg, 39 µg, 40 µg, 41 µg, 42 µg, 43 µg, 44 µg, 45 µg, 46 µg, 47 µg, 48 µg, 49 µg, 50 µg, 51 µg, 52 µg, 53 µg, 54 µg, 55 µg, 56 µg, 57 µg, 58 µg, 59 µg, 60 µg, 61 µg, 62 µg, 63 µg, 64 µg, 65 µg, 66 µg, 67 µg, 68 µg, 69 µg, 70 µg, 71 µg, 72 µg, 73 µg, 74 µg, 75 µg, 76 µg, 77 µg, 78 µg, 79 µg, 80 µg, 81 µg, 82 µg, 83 µg, 84 µg, 85 µg, 86 µg, 87 µg, 88 µg, 89 µg, 90 µg, 91 µg, 92 µg, 93 µg, 94 µg, 95 µg, 96 µg, 97 µg, 98 µg, 99 µg, 100 µg, 150 µg, 200 µg, 250 µg, 300 µg, 350 µg, 400 µg, 450 µg, 500 µg, 550 µg, 600 µg, 650 µg, 700 µg, 750 µg, 800 µg, 850 µg, 900 µg, 950 µg, 1000 µg. Por otra parte, las líneas celulares y los dispositivos de la presente invención son capaces de expresar esta cantidad terapéutica durante un período de al menos tres meses.

Los trastornos oftálmicos que se pueden tratar mediante diversas realizaciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a retinopatía diabética, edema macular diabético, retinopatías proliferativas, enfermedades vasculares de la retina, anomalías vasculares, degeneración macular relacionada con la edad y otros trastornos adquiridos, endoftalmítis, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias pero no infecciosas, trastornos relacionados con el SIDA, síndrome ocular de isquemia, trastornos relacionados con el embarazo, degeneraciones retinianas periféricas, degeneraciones de la retina, retinopatías tóxicas, tumores de retina, tumores coroides, trastornos de la coroides, trastornos vítreos, desprendimiento de retina y vitreoretinopatía proliferativa, trauma no penetrante, trauma penetrante, complicaciones post-cataratas, y neuropatías ópticas inflamatorias.

Los expertos en la técnica reconocerán que la degeneración macular relacionada con la edad incluye, pero no se limita a, degeneración macular húmeda y seca relacionada con la edad, degeneración macular relacionada con la edad exudativa, y degeneración miópica.

En algunas realizaciones preferidas, el trastorno a ser tratado es la forma húmeda de la degeneración macular relacionada con la edad o la retinopatía diabética. La presente invención también puede ser útil para el tratamiento de la neovascularización ocular, una condición asociada con muchas enfermedades y trastornos oculares. Por

ejemplo, la neovascularización ocular asociada a la isquemia retinal es una causa importante de la ceguera en la diabetes y otras muchas enfermedades.

5 Las líneas celulares y dispositivos de la presente invención también pueden usarse para tratar síntomas oculares resultantes de enfermedades o condiciones que tienen tanto síntomas oculares como no oculares. Algunos ejemplos incluyen la retinitis por citomegalovirus en el SIDA, así como otras condiciones y trastornos del vítreo; cambios hipertensivos en la retina como consecuencia del embarazo; y efectos oculares de diversas enfermedades infecciosas como la tuberculosis, la sífilis, enfermedad de Lyme, enfermedad parasitaria, *Toxocara canis*, oftalmomiasis, cisticercosis y las infecciones por hongos.

10 Los dispositivos y líneas celulares también pueden ser usados para tratar condiciones relacionadas con otras enfermedades intraoculares basadas en la neovascularización. Por ejemplo, tal neovascularización puede ocurrir en enfermedades tales como la retinopatía diabética, oclusión de la vena central de la retina y, posiblemente, degeneración macular relacionada con la edad. La neovascularización corneal es un problema importante, ya que interfiere con la visión y predispone a los pacientes a fracaso del injerto de córnea. Una mayoría de la pérdida visual severa está asociada con los trastornos que resultan en una neovascularización ocular.

15 La invención también se refiere a métodos y al suministro de la estructura anticuerpo anti-angiogénica o receptores de VEGF solubles o receptores de PDGF con el fin de tratar trastornos proliferativos de células, tales como, por ejemplo, trastornos hematológicos, aterosclerosis, inflamación, aumento de la permeabilidad vascular, y malignidad dentro del entorno ocular o en el exterior en regiones diana deseadas dentro del cuerpo.

20 El uso de los dispositivos y las técnicas descritas en este documento proporcionan varias ventajas respecto a otras rutas de suministro: las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o receptores de VEGF o receptores de PDGF se pueden suministrar al ojo directamente, lo que reduce o minimiza los efectos secundarios periféricos no deseados y dosis muy pequeñas de la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o del receptor (es decir, cantidades de nanogramo o pocos microgramos en lugar de miligramos) pueden ser suministradas en comparación con las aplicaciones tópicas, con lo que también potencialmente se reducen los efectos secundarios. Por otra parte, ya que
25 las células viables continuamente producen estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas y receptores recién sintetizados, estas técnicas deben ser superiores al suministro por inyección de la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o receptor de VEGF, en donde la dosis varía mucho entre las inyecciones y la estructura de anticuerpo anti-angiogénica o receptor se degrada de forma continua, pero no se repone continuamente.

30 Las células vivas y las líneas celulares modificadas por ingeniería genética que secretan las estructuras de anticuerpo anti-angiogénicas o receptores de VEGF solubles de la invención pueden ser encapsuladas en el dispositivo de la invención y ser insertadas quirúrgicamente (bajo anestesia retrobulbar) en cualquier estructura anatómica apropiada del ojo. Por ejemplo, los dispositivos pueden ser insertados quirúrgicamente en el humor vítreo del ojo, donde son anclados preferiblemente a la esclerótica para ayudar en la eliminación. Los dispositivos pueden permanecer en el vítreo tanto tiempo como sea necesario para conseguir la profilaxis o la terapia deseada. Por
35 ejemplo, la terapia deseada puede incluir la promoción de la supervivencia de neuronas o fotorreceptores o su reparación, o la inhibición y/o inversión de la neovascularización retinal o coroidal, así como la inhibición de la inflamación uveal, retinal y del nervio óptico. Con la colocación vítrea, la estructura del anticuerpo anti-angiogénica o el receptor de VEGF, se pueden suministrar a la retina o al epitelio pigmentario de la retina (EPR).

40 En otras realizaciones, los dispositivos cargados con células se implantan periocularmente, dentro o debajo del espacio conocido como cápsula de Tenon, lo que es menos invasivo que la implantación en el vítreo. Por lo tanto, las complicaciones tales como las hemorragias del vítreo y/o el desprendimiento de retina están potencialmente eliminados. Esta vía de administración también permite la administración de las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o receptores de VEGF solubles o receptores de PDGF descritos en este documento a la RPE o la retina. La implantación periocular es especialmente preferida para el tratamiento de la neovascularización coroidea y
45 la inflamación del nervio óptico y del tracto uveal. En general, el suministro de sitios de implantación perioculares permitirá la circulación de las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o receptores de VEGF solubles a la vasculatura coroidal, la vasculatura retinal, y el nervio óptico.

50 El suministro de factores anti-angiogénicos, tales como las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o los receptores de VEGF solubles de la invención, directamente a la vasculatura coroidal (periocularmente) o al vítreo (intraocularmente) utilizando los dispositivos y métodos descritos en este documento puede reducir o aliviar los problemas asociados con los métodos y dispositivos de tratamiento de la técnica anterior y puede permitir el tratamiento de la neovascularización coroidea poco definida u oculta, así como proporcionar una forma de reducir o prevenir la neovascularización coroidal recurrente a través de terapia adyuvante o de mantenimiento.

55 La implantación de los dispositivos biocompatibles de la invención se lleva a cabo en condiciones estériles. El dispositivo puede ser implantado usando una jeringa o cualquier otro método conocido por los expertos en la técnica. Generalmente, el dispositivo se implanta en un sitio en el cuerpo del receptor que permitirá el suministro apropiado del producto secretado o la función al receptor y de nutrientes a las células o tejidos implantados, y también permitirá el acceso al dispositivo para su recuperación y/o reemplazo. Se contemplan una serie de diferentes lugares de implantación. Estos incluyen, por ejemplo, el humor acuoso, el humor vítreo, la cápsula sub-

Tenon, el espacio periocular, y la cámara anterior. Preferiblemente, para sitios de implante que no son inmunológicamente privilegiados, tales como los sitios periorbitales, y otras áreas fuera de la cámara anterior (acuoso) y la cámara posterior (vítreo), las cápsulas son inmunoaislantes.

5 Es preferible verificar que las células inmovilizadas dentro del dispositivo funcionan correctamente tanto antes como después de la implantación. Cualesquiera ensayos o pruebas de diagnóstico bien conocidos en la técnica se pueden usar para estos propósitos. Por ejemplo, puede ser utilizado un ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), ensayos cromatográficos o enzimáticos, o bioensayos específicos para el producto secretado. Si se desea, la función secretora de un implante se puede controlar a través del tiempo mediante la recopilación de muestras apropiadas (por ejemplo, suero) del receptor y analizándolas.

10 El uso de muchos de los dispositivos y técnicas quirúrgicas de la técnica anterior dieron lugar a un gran número de desprendimientos de retina. La aparición de esta complicación se reduce debido a que los dispositivos y métodos de esta invención son menos invasivos en comparación con las diversas otras terapias.

15 También se pueden usar de acuerdo con esta invención formas modificadas, truncadas y/o de muteína de las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas y los receptores de VEGF descritos en el presente documento. Además, también se contempla el uso de fragmentos activos de estas estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o receptores (es decir, aquellos fragmentos que tienen actividad biológica suficiente para conseguir un efecto terapéutico). También se contemplan estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas receptoras modificadas por la unión de uno o más de polietilenglicol (PEG) u otros restos poliméricos de repetición, así como combinaciones de estas proteínas y las versiones policistrónicas de las mismas.

20 El tratamiento de muchas condiciones de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento requerirá sólo uno o a lo sumo menos de 50 dispositivos implantados por ojo para suministrar una dosis terapéutica apropiada. Las dosis terapéuticas pueden estar entre aproximadamente 0,1 pg y 1000 µg por ojo por paciente por día (por ejemplo, entre 0,1 pg y 500 µg; entre 0,1 pg y 250 µg, entre 0,1 pg y 100 µg; entre 0,1 pg y 50 µg; entre 0,1 pg y 25 µg; entre 0,1 pg y 10 µg; entre 0,1 pg y 5 µg; entre 0,1 pg y 100 ng; entre 0,1 pg y 50 ng; entre 0,1 pg y 25 ng; entre 0,1 pg y 10 ng, o entre 0,1 pg y 5 ng por ojo por paciente por día). En un ejemplo no limitante, la cantidad terapéutica es al menos 0,5-50 µg/ml en estado estacionario en el ojo. Cantidades terapéuticas adecuadas pueden incluir, por ejemplo, 0,5 µg, 0,6 µg, 0,7 µg, 0,8 µg, 0,9 µg, 1 µg, 2 µg, 3 µg, 4 µg, 5 µg, 6 µg, 7 µg, 8 µg, 9 µg, 10 µg, 11 µg, 12 µg, 13 µg, 14 µg, 15 µg, 16 µg, 17 µg, 18 µg, 19 µg, 20 µg, 21 µg, 22 µg, 23 µg, 24 µg, 25 µg, 26 µg, 27 µg, 28 µg, 29 µg, 30 µg, 31 µg, 32 µg, 33 µg, 34 µg, 35 µg, 36 µg, 37 µg, 38 µg, 39 µg, 40 µg, 41 µg, 42 µg, 43 µg, 44 µg, 45 µg, 46 µg, 47 µg, 48 µg, 49 µg, 50 µg, 51 µg, 52 µg, 53 µg, 54 µg, 55 µg, 56 µg, 57 µg, 58 µg, 59 µg, 60 µg, 61 µg, 62 µg, 63 µg, 64 µg, 65 µg, 66 µg, 67 µg, 68 µg, 69 µg, 70 µg, 71 µg, 72 µg, 73 µg, 74 µg, 75 µg, 76 µg, 77 µg, 78 µg, 79 µg, 80 µg, 81 µg, 82 µg, 83 µg, 84 µg, 85 µg, 86 µg, 87 µg, 88 µg, 89 µg, 90 µg, 91 µg, 92 µg, 93 µg, 94 µg, 95 µg, 96 µg, 97 µg, 98 µg, 99 µg, 100 µg, 150 µg, 200 µg, 250 µg, 300 µg, 350 µg, 400 µg, 450 µg, 500 µg, 550 µg, 600 µg, 650 µg, 700 µg, 750 µg, 800 µg, 850 µg, 900 µg, 950 µg, 1000 µg. Por otra parte, las líneas celulares y los dispositivos de la presente invención son capaces de expresar esta cantidad terapéutica durante un período de al menos tres meses.

Cada uno de los dispositivos oftálmicos de la presente invención es capaz de almacenar entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 750.000 células, en forma individual o agrupada, dependiendo de su tipo.

40 La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1: Sub-clonación celular

45 Varias estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas y receptores de VEGF solubles se expresaron en células NTC-200. Como se describe en el presente documento, los términos "NTC-200" y "células ARPE-19" se usan indistintamente para describir los tipos de células preferidos que se han diseñado genéticamente para expresar las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas y receptores de VEGF solubles y PDGF de la invención.

50 Para lograr la secreción de la proteína, las construcciones contenían ya sea la secuencia líder de inmunoglobulina murina nativa o IgSP, el último de los cuales se utilizó anteriormente para dirigir la secreción de CNTF a partir de células NTC-200. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las proteínas destinadas y las secuencias de ácido nucleico correspondientes, se describen en el presente documento como sigue:

1) p834

2) p838

3) p876

4) p873

- 5) p874
- 6) p875
- 7) p915
- 8) p914
- 5 9) p916
- 10) p913
- 11) p917
- 12) p964
- 13) p963
- 10 14) p974
- 15) p978
- 16) p977

Para los receptores de VEGF solubles (por ejemplo, p834, p838, y p873), fueron amplificados fragmentos de genes a partir de cDNA de sVEGFRI (hFlt) o sVEGFR2 (hKDR) (números de entrada de GenBank U01134 y AF063658, respectivamente) por PCR usando pares de cebadores de oligonucleótidos específicos para el producto deseado. Las estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas descritas en este documento (por ejemplo, p876, p874, p875, p895, p896, p913 y p897) se diseñaron basándose en porciones de las secuencias de compuestos conocidos anti-VEGF tales como el bevacizumab y ranibizumab (Genentech). Los productos amplificados se digirieron con la endonucleasa de restricción apropiada y se ligaron en el vector de expresión de mamífero de Neurotech pCpGfree-vitro (InvivoGen), cuyo esquema se muestra en la Figura 1. El pCpGfree-vitro es un vector comercialmente disponible completamente desprovisto de dinucleótidos CpG, que además incorpora estratégicamente colocados aisladores S/MARS, lo que reduce así la posibilidad de silenciar o la interacción del gen. Además, las secuencias de S/MARS pueden ayudar en la integración cromosómica en el genoma del huésped. Este diseño hace que sea menos probable que la expresión del gen insertado sea silenciada (desactivada) por la maquinaria celular. En las comparaciones con otros vectores de expresión (PcDNA, Pkan, pCl-Neo etc.), pCpGfree vitro genera consistentemente líneas celulares recombinantes estables de mayor producción. El sistema vector pCpGfree-vitro incluye tres formas de vectores de expresión diferenciados por la presencia de cualquiera de los genes de resistencia a la neomicina, blasticidina, o higromicina. Subclonando secuencias de ADNc idénticas en cada uno de los vectores de expresión basados en la resistencia de neomicina, blasticidina y higromicina, las líneas celulares pueden ser transfectadas de manera iterativa, usando diferentes marcadores de selección para cada iteración. Dicho método permite la amplificación de dosis génica sin la necesidad de generar cepas de DHFR normalmente encontradas en las líneas celulares CHO de fabricación.

Se seleccionaron clones recombinantes transformados con blasticidina o neomicina (G418), o higromicina y el ADN del plásmido miniprep purificado se analizó por digestión de restricción y análisis de electroforesis en gel de agarosa. Todos los clones de plásmidos putativos que contienen un apropiado inserto se verificaron mediante secuenciación didesoxi automática (GeneWiz, Edison, NJ) seguido de ensamblajes de cromatogramas utilizando el software de análisis de secuencia de Vector NTI v10.0 (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA).

Ejemplo 2: Construcción de la línea celular

Se utilizaron clones de plásmidos verificados para transfectar las células NTC-200 para obtener líneas celulares policlonales estables. Brevemente, fueron transfectadas 200-300K células, sembradas 18 horas antes, con 3,0 µg de ADN de plásmido utilizando 6,0 µl de reactivo de transfección de Fugene 6 (Roche Applied Science, Indianapolis IN) según las recomendaciones del fabricante. Las transfecciones se realizaron en 3,0 ml de DME/F12 con 10% de FBS, SFM endotelial o medio Optimem (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA). De veinticuatro a 48 horas más tarde las células fueron o bien alimentadas con medio fresco que contenía 1,0 µg/µl de G418 o fueron pasadas a un matraz de cultivo de tejidos T-25 que contenía G418. Las líneas celulares se pasaron bajo selección durante 14-21 días hasta que el crecimiento normal se reanudó, después de cuyo tiempo el fármaco se retiró y las células se les permitió recuperarse (~ 1 semana) antes de la caracterización.

Estas líneas celulares policlonales se dispersaron, y luego se sembraron en platos. Después de un crecimiento apropiado, de cientos a miles de colonias individuales se podían discernir por microscopía, se recogieron y amplificaron por clonación. Los sobrenadantes del subclón se analizaron por ELISA para la producción de moléculas recombinantes y se combinaron con la determinación del número de células, se permitió la generación de la productividad clonal jerarquizada. Se seleccionaron líneas celulares clonales deseables según la estabilidad, la

productividad y las características biofísicas in vivo en el dispositivo ECT y los resultados biológicos en estudios con animales.

5 La estabilidad de la expresión de la proteína recombinante a partir de estas líneas celulares se midió en el transcurso de varias semanas utilizando el Kit ELISA humano sVEGF R1/Flt1 Quantikine (R&D Systems, Minneapolis, MN) o un ELISA IgG1 Fc policlonal anti-humano (Neurotech). Brevemente, 50K células, previamente sembradas en 12 placas de cultivo de tejidos en DMEM/F12 con 10% FBS, se lavaron dos veces en HBSS (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA), se pulsaron luego durante 2 horas con 1,0 ml de SFM endotelial (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA). Los medios de pulso se almacenaron a -20°C y se ensayaron una semana después de la recolección según el protocolo del fabricante.

10 Las líneas celulares estables que secretaban la proteína codificada por las siguientes estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas y receptores de VEGF y PDGF truncados se crearon correctamente:

1) p834

2) p838

3) p876

15 4) p873

5) p874

6) p875

7) p915

8) p914

20 9) p916

10) p913

11) p917

12) p964

13) p963

25 14) p974

15) p978

16) p977

Ejemplo 3: Selección de la línea celular y determinación de resultados

30 Líneas celulares recombinantes NTC-200 que expresaban moléculas anti-angiogénicas se generaron como se describe; se muestra en este documento un ejemplo de una selección de cribado para la molécula p834, una molécula de VEGFR-Fc. Se aplicaron ensayos ELISA anti-VEGFR a los sobrenadantes clonales y el método kit 8 de recuento de células (CCK-8, Dojindo Inc.) se usó para enumerar el número de células del clon analizado. En este ejemplo, el rango de clasificación de los clones indica que al menos 8 resultados clonales tienen una productividad mayor de 10.000 ng/millones de células/día (10 picogramos/célula/día (PCD)), en esta prueba de detección ELISA.

35 En el gráfico de dispersión mostrado en la Figura 2, los subclones p834 se representaron gráficamente utilizando el resultado del ELISA frente al número de células, lo que permitió la visualización de las líneas clonales que pueden presentar beneficiosas propiedades de crecimiento y secreción para la beneficiosa propagación ampliada de ECT.

40 La producción de la línea celular actual de 9 diferentes Fc-moléculas basadas en anticuerpos y receptores da como resultado resultados de líneas de células que se encuentran en el intervalo de 7 - 20 pcd, como se muestra en la Tabla 1. Estos niveles están a la par con los niveles de producción obtenidos por los procesos de fabricación de la línea de CHO de rutina. En cada caso, además del clon clasificado en la parte superior para ECT, se seleccionaron al menos 5 subclones independientes para cada entidad molecular como líneas de células de apoyo. El éxito de la generación de alta producción de líneas celulares basados en anticuerpos y el receptor Fc indican que la línea celular NTC-200/el sistema de expresión PCPG pueden ser ampliamente aplicados a moléculas bioterapéuticas,

45 especialmente las representadas por los productos fabricados a partir de CHO conocidos.

Tabla 1. Resultados de las líneas celulares ejemplares (picogramos/célula/día)

Construceto	Línea celular ejemplar	Tipo	Resultado de la línea celular pcd
VEGFR-Fc N° 1	834-10-5	Clonal	10
VEGFR-Fc N° 2	838-6-2	Clonal	10
VEGFR-Fc N° 3	873-6-10	Clonal	7,8
VEGFR-Fc N° 4	917-7	Policlonal	8,5
Anticuerpo N° 1	874-1-23	Clonal	21
Anticuerpo N° 2	916-6	Policlonal	23
Anticuerpo ScFv N° 1	876-9-3	Clonal	11,2
Anticuerpo ScFv N° 2	913-10	Policlonal	8,3
Anticuerpo Fab	915-6	Policlonal	11,8

Ejemplo 4: Caracterización de proteínas

Expresión de proteínas

- 5 La estructura de la molécula p834 se basa en una molécula quimérica VEGF-receptor 1 dominio 2 y VEGF-receptor 2 dominio 3 fusionada en marco a un dominio de IgG1 Fc humano. La proteína p834-10-5 en el medio acondicionado de la línea celular tiene un peso molecular dimérico pronosticado de 100 kDa (no glicosilado) y un observado de ~ 130 kDa (glicosilado) en Western Blot no reductor. El peso molecular monomérico pronosticado de 834-10-5 es 50 kDa con un peso molecular observado de ~60 kDa (glicosilado) en Western Blot reductor. La purificación por afinidad de la proteína G del medio acondicionado de la línea celular 834-10-5 revela una banda única en condiciones no reductoras de SDS-PAGE, en consonancia con los resultados observados en el análisis de Western Blot. La alta productividad de la línea celular 834-10-5 se demostró por un rendimiento de 15 mg/litro de cultivo de Hyperflask. (Véase la Figura 3).

Bioensayo HUVEC

- 15 El VEGF-A es conocido por su capacidad de estimular la proliferación de células HUVEC in vitro. Así, un bioensayo adecuado para la medición de la inhibición de VEGF-A sería la titulación de una molécula inhibidora frente a una cantidad conocida de VEGF-A como estimulador de las células HUVEC (R&D Systems). El medio acondicionado de las líneas celulares p834-10-5 se recogió y se diluyó en serie para inhibir la estimulación de VEGF-A de las células HUVEC. Se encontró que el medio acondicionado de p834-10-5 en este ensayo muestra un EC50 = ~50 pM con 100% de inhibición = ~100 pM, como se muestra en la Figura 4. La actividad inhibidora de p834-10-5 es similar a la bioactividad del control de VEGFR-Fc(R&D Systems), y también de la bioactividad del medio condicionado de la línea celular policlonal p838-6. En resumen, la proteína recombinante a partir de estas líneas celulares puede inhibir de manera eficiente la proliferación de células endoteliales de forma similar a la proteína control (VR1 DI-3-Fc). Sin embargo, el medio acondicionado a partir de las células parentales transfectadas de manera simulada (WT) no inhibió el crecimiento de HUVEC.

Ensayo de unión de solución

- 30 Se llevaron a cabo estudios de unión de la solución de VEGF utilizando medio acondicionado de las líneas celulares transfectadas. En pocas palabras, cantidades tituladas de medio acondicionado se incubaron durante la noche a temperatura ambiente en presencia de VEGF. VEGF libre se midió utilizando un EIA sensible (R&D Systems, Minneapolis, MM) y se realizó el análisis de regresión no lineal (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

- 35 La actividad de unión de moléculas recombinantes a partir de p834-10-5 TEC se verificó biofísicamente por la capacidad de las muestras ECT p834-10-5 vítrea y de medio de condición explante para inhibir o interferir con la reactividad de un ELISA comercial sándwich de VEGF (R&D Systems). Como se muestra en la Figura 5, las muestras p834-10-5 muestran un IC50 = ~ 12 pM mientras que una inhibición > 90% se observa a ~ 100 pM. Esta actividad inhibidora se detectó a partir de la proteína purificada, a partir del vítreo de conejo no inmunodeprimido que contenía dispositivos p834-10-5 ECT (1 ó 3 meses de punto de tiempo), o a partir de las proteínas secretadas producidas por dispositivos p834-10-5 ECT explantados de conejos. Como control negativo, se demostró que el medio acondicionado a partir de células parentales transfectadas de manera simulada (WT) no se unía a VEGF.

Ejemplo 5: Caracterización del dispositivo y resultados de la implantación

Estudios de la estabilidad de la línea celular

Un criterio para la fabricación de líneas celulares recombinantes es el límite de la productividad por la expansión clonal. Se calculó que el análisis de crecimiento y productividad de 40 generaciones de células clonales confirmarían la estabilidad del producto, así como proporcionaría una información suficiente para la creación de un banco de células madre (por el paso ~17) y un banco de células de trabajo (por el paso ~23). Un banco de células de trabajo se calcula que es suficiente para la fabricación de al menos 100.000.000 de dispositivos. El paso en serie de la línea celular p834-10-5 reveló la estabilidad en más de 40 generaciones en el cultivo de tejidos con una producción promedio de 10,4 pcd (picogramos/célula/día) sobre el conjunto de puntos de tiempo ensayados. (Véase la Figura 6).

Estudios cronológicos de producción del dispositivo

Se expandieron líneas celulares p834-10-5 a partir de una alícuota de un banco de células de investigación y se expandieron antes del llenado del dispositivo. Las células fueron encapsuladas mediante la inyección en dispositivos ECT de 6 mm con paredes construidas con membranas semipermeables de polisulfona y rellenas de hilo de tereftalato de polietileno (PET) para la unión celular. Los dispositivos se colocaron individualmente en envases primarios de recipientes sellados con medios nutrientes y se incubaron a 37°C durante 10 semanas. Durante el curso del tiempo de mantenimiento de la incubación, la producción de proteína recombinante se examinó periódicamente desde los dispositivos ECT mediante la retirada de los envases y el ensayo de la secreción de proteínas por p834-10-5 por ELISA. Los resultados muestran una producción del dispositivo inicial de 480 ng/dispositivo/día de proteína p834-10-5, disminuyendo gradualmente a una producción de línea de base de ~ 60 ng/dispositivo/día después de 6 semanas. En la Figura 7, las secciones histológicas de dos dispositivos revelan un fuerte crecimiento celular de 834-10-5 internamente, lo que demuestra una alta viabilidad a través de un cultivo de un dispositivo de un mes.

Los dispositivos que contenían células ARPE-19, modificadas mediante ingeniería genética para segregar las construcciones VEGFR p838 y p834, mostraron un excelente perfil de seguridad a los 1 y 3 meses después del implante. Por otra parte, estos dispositivos ("los dispositivos de NT-503") son estables in vivo a los 1 y 3 meses después del implante.

La Tabla 2 muestra los datos de PK para estos dispositivos NT-503:

Tabla 2: PK de NT-503

Línea celular	Producción del dispositivo (ng/día)	Niveles vítreos (ng/ml)
p838 (mantenido 3 semanas)		
1 mes	38 ±10,2	63 ± 5,3
3 meses	27 ± 7,4	34 ±2,8
p834 (mantenido 4 semanas)		
1 mes	439±127	803±107
3 meses	300 ± 54	350 ±111

La Tabla 3 muestra los resultados de la estabilidad del almacenamiento del dispositivo NT-503:

Tabla 3: Tiempo de conservación de NT-503: Estabilidad in vivo demostrada

Tiempo de conservación de 4 semanas

Línea celular	Mantenido in vitro (Semanas)	Pre-implante (ng/día)	Explante 1 mes in vivo (ng/día)	Vítreo 1 mes in vivo (ng/ml)
p838	Semana 1	139	61	120
	Semana 3	30	71	40
p834	Semana 1	478	345	644
	Semana 4	74	501	518

5 Como se muestra anteriormente, el dispositivo P834 suministró un nivel de 13 veces más alto de receptores de VEGF en comparación con p838. En cualquier caso, tanto la producción del dispositivo in vitro como el rendimiento in vivo (tal como se mide por los niveles vítreos) se mantuvieron estables para el NT-503. Además, una evaluación de períodos mantenidos in vitro y el correspondiente rendimiento in vivo de los dispositivos NT-503 implantados han demostrado una estabilidad de la vida útil de una duración de hasta 4 semanas.

10 Por lo tanto, los dispositivos de p834 se pueden utilizar en ensayos clínicos en humanos en curso para asegurar con éxito la prueba de concepto en los seres humanos. Por otra parte, se realizará un trabajo adicional para seleccionar los clones P838 que producen más alto para la segunda cohorte de este ensayo clínico (la línea celular p838 actual es una línea celular policlonal).

Por último, si es posible, se harán esfuerzos continuos para extender la vida útil de los dispositivos de NT-503 durante más de 4 semanas. Sin embargo, esto, por el momento, no es necesario ya que la mayoría de los productos de terapia celular utilizados en la técnica tienen una vida de almacenamiento de 1 semana.

Ejemplo 6: Estudios en animales

15 A las cuatro semanas después del envasado, los dispositivos se implantaron en ojos de conejos blancos de Nueva Zelanda no inmunodeprimidos. Para determinar la producción de p834-10-5 después de un mes y tres meses después de la implantación, los animales fueron enucleados y las concentraciones de p834-10-5 fueron cuantificadas a partir del vítreo extraído y en comparación con la productividad del dispositivo explantado. Un mes después de la implantación, los dispositivos explantados produjeron la proteína p834-10-5 en más que 100
20 ng/ml/día, con concentraciones vítreas en estado estacionario de más de 250 ng/ml. A los tres meses después de la implantación, los dispositivos explantados continuaron la producción en más de 200 ng/ml, mientras que se detectaron concentraciones vítreas en más de 700 ng/ml. (Véase la Tabla 4). Después de un año, las muestras de vítreo de los conejos contenían 350 ng/ml de proteína p834-10-5, lo que demuestra una producción continuada del receptor recombinante en el transcurso de 12 meses.

25 Como se muestra en la Figura 8, la histología de los dispositivos explantados después de tres meses de la implantación reveló un crecimiento celular robusto, de forma análoga a la morfología celular observada en la muestra de los dispositivos mantenidos en contenedores mostrados en la Figura 7. No se observaron eventos adversos significativos dentro del ojo de los conejos tratados durante el estudio, cuando se examinó periódicamente por un oftalmólogo veterinario.

30 Tabla 4: Producción in vivo de p834

Identificador de la muestra	Producción del dispositivo en 1 Mes (ng/día)	Niveles vítreos en 1 Mes (ng/ml)
Ojo Nº 1	250	760
Ojo Nº 2	500	700
Ojo Nº 3	482	800
Ojo Nº 4	525	950
	Producción del dispositivo en 3 Meses (ng/día)	Niveles vítreos en 3 Mes (ng/ml)
Ojo Nº 5	350	200
Ojo Nº 6	270	400
Ojo Nº 7	340	340
Ojo Nº 8	240	460

Ejemplo 7: La dosificación del gen iterativa aumenta la producción de proteínas recombinantes

35 Una transfección iterativa se utilizó para aumentar la dosis de los genes, en particular del ADNc de p834. Tres plásmidos de expresión que tienen ADNc de 834 idéntico se produjeron: p834 PCPGvitrofree (resistente a la blasticidina), p910 PCPGvitrofree (resistente a la neomicina) y P969 PCPGvitrofree (resistente a la higromicina). p910 se transfectó en las líneas celulares resistentes a blasticidina p834-10-5 y los clones integrantes dobles resultantes fueron recuperados por la aplicación de la selección con neomicina. Los subclones que superaron los niveles de producción de PCD de p834-10-5 fueron aislados. Como se muestra en la Figura 9, la transfección inicial de una vez ("1x") produjo la línea celular p834-10-5 mencionada anteriormente con los niveles de producción de

5 células desnudas (ELISA Fc) a 15-20 PCD. La transfección y selección de los clones p910 de los clones 834-10-5 parenterales produjeron los clones 910 (834-10-5)-4-47 con niveles de producción de 35-40 PCD. La transfección iterativa y la selección de p969 en el subclón 910 (834-10-5)-4-47 produjeron los numerosos clones derivados de p969 resistentes a higromicina, con aislamientos iniciales que secretaban niveles de proteína recombinante que van desde 50 PCD a > 100 PCD. El mantenimiento de la expresión de los tres eventos de integración genéticos fue confirmado por el cultivo de 969 líneas clonales en cada uno de los medios de cultivo de blasticidina, higromicina, y neomicina. Los clones de la transfección triple estaban presentes lo que demostró una pérdida mínima en la potencia según lo determinado por los ensayos de ELISA, basado en la unión directa de la proteína recombinante a la placa VEGF unida seguido de la detección usando Fc anti-humano. Sorprendentemente, se detectaron hasta 10 valores 8 veces más altos de proteína recombinante que la simple adición aritmética de la dosis de genes basado en la transfección 3 x, lo que sugiere que una selección biológica inesperada, sinérgica, está involucrada en el aumento de la dosis génica por transfección en serie (por ejemplo, usando un proceso de transfección iterativa).

Ejemplo 8: Estudios preclínicos de aumento de la dosis de líneas celulares transfectadas de forma iterativa

15 Siguiendo el método del Ejemplo 6, la doble línea celular transfectante 910(834-10-5)-4-47, y la triple línea celular transfectante 969(910(834-10-5)-4-47)-33 se utilizaron para generar los dispositivos de ECT, y posteriormente se implantaron en conejos. Después de un mes de la implantación, los conejos fueron enucleados y el vítreo se extrajo para cuantificar los niveles de proteína 834.

20 Al mismo tiempo, los dispositivos se eliminaron quirúrgicamente, y los dispositivos explantados se cultivaron después en medio de crecimiento celular para determinar la productividad del dispositivo de la proteína recombinante. Como se muestra en la Tabla 5, la producción de los dispositivos 910 y 969 dieron como resultado niveles en estado estacionario del vítreo de proteína 834 a niveles de casi 5 y 10 veces mayor, respectivamente, que los observados con las proteínas 834 transfectadas una vez (Tabla 5). Consistente con los datos de producción de PCD de la línea celular, se observó una concentración en estado estacionario de la proteína de 834 in vivo más alta de lo esperado por el simple efecto aditivo de la dosis del gen transfectado en serie, (Tabla 6 vs. Tabla 4); de nuevo 25 lo que sugiere es una selección biológica sinérgica inesperada de mejora de la secreción sinérgica debido a la metodología de transfección iterativa.

Tabla 5. Producción in vivo de la proteína p834 por dispositivos 910(834-10-5)-4-47

Identificador de la muestra	Producción del dispositivo en 1 Mes (ng/día)	Vítreo en 1 Mes (ng/ml)
Ojo N° 9	1432	3641
Ojo N° 10	2135	5572
Ojo N° 11	2433	2710
Ojo N° 12	1844	3603

Tabla 6. Producción in vivo de la proteína p834 por 969[910(834-10-5)-4-47]

Identificador de muestra	Producción del dispositivo en 1 Mes (ng/día)	Niveles vítreos en 1 Mes (ng ml)
Ojo N° 13	2511	9390
Ojo N° 14	3819	16031
Ojo N° 15	2055	7115
Ojo N° 16	2691	5680
Ojo N° 17	2145	10968
Ojo N° 18	2464	10840

30

Ejemplo 9: Transfecciones de p544 (CNTF) aplicadas a la línea celular 834-10-5

35 En una realización de la transfección de ADN secuencial, los vectores de expresión de codificación de los ADNc no relacionados (es decir, diferentes) se pueden usar para generar líneas celulares que secretan dos diferentes proteínas con funciones diferentes. Un CNTF que expresa el vector p544, que codifica el factor neurotrófico ciliar, una citoquina con efectos neuroprotectores en la retina de pacientes con retinitis pigmentosa y atrofia geográfica, se transfectó en líneas celulares 834-10-5. Se seleccionaron las células transfectadas contra los antibióticos y las líneas

celulares que producían más altamente CNTF y la proteína de 834 fueron recuperadas, basado en los respectivos ensayos ELISA. Utilizando la transfección iterativa, se obtuvieron una serie de clones CNTF/834 positivos que se describen en la Tabla 6.

5 Curiosamente, dentro de estos clones altamente productores, no se observó pérdida de producción basado en los clones 834-10-5 parenterales o por la expresión de CNTF derivada de P544, en comparación con los controles de la línea celular de CNTF histórica (~0,5 PCD), lo que demuestra el potencial de la terapia de combinación por encapsulación de las líneas celulares expresantes duales, sin pérdida de fidelidad de producción en comparación con los niveles de expresión parenterales. Estos resultados muestran que las terapias ECT no están limitadas a la producción de una única entidad molecular, y que se pueden generar líneas celulares que secreten múltiples moléculas terapéuticas. En este caso, CNTF funciona como una terapia neuroprotectora frente a la AMD seca y el antagonista VEGF funciona como una terapia antiangiogénica contra la DMAE húmeda.

A continuación se proporcionan las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de p544:

CNTF p544 (con intrón genómico)

```
atgaaatgcagctgggttatcttctctctgatggcagtggttacaggaaggggctcccaag
tcccaaaactgaggggtccataaaactctgtgacagtggaactcactttgccttcttctaca
ggggtgaattcggctttcacagagcattcaccgctgaccctcaccgctgggacctctgtag
ccgctctatctggctagcaaggaagattcgttcagacctgactgctcttacggaatcctatg
taagttgacctatcttctgttctctgtttcccttcatctttttgatccagcaactacca
tcacgcacagctccattaccaattgtgaaagctctaatacatatagtcattcatataggta
tttgacatgggcccctcccttgaggaaaaccatgtgactttatcttctctctgggctgtt
taggagatgaagttacttgaatgagaaaatatataggagttctagaaaggattggttata
tgtcttggaggctattccaaatttattggcatatattctgaataactactagaacagattagc
catgggcccctctgggttcttcatagccattgttctgaatttttagctatgtaaagaaagg
tttatgggtaggaagagtagtactatgaacgtgggaggaatttgtaaactaccaatttctcc
tatatagcattagccaccacccttttagtattctgcatcaaaagtagattgtgtctaaagag
aaaggtaagctatcaaaaggatctcctagaagattcattggaaacttgggaagtgtcaaat
tcttgagctaatctggagttccagatttgtcttcaacagtaaggggatccccatcaattt
ccacctgagatagctgtggaaataactccaaccctgtggagagttttgaatttaggctgag
aactgatttatcttctgtacagcctcaccagacagaaaatcagactcttgggagtgctcaatg
gggagaggggaagttagagaaaattcacaatggctatattccaagtttctctagttgtggca
gtgtctttacaagtagtggtaaaaacttttaatatgattaaaatattccagttaatgaga
gagtttgaagtgaaggaagaaaattcttcaaatcagttttcaacctttagaactcaataaa
atctgaacattcttcaagaaaaatccataggtagtcaatttcaggcagttattgggtctttc
taaagtccagctcatagagccaaattaagagttcctactgtagacatattattactttaca
acttggatccttggccagagagatgagtgagattttgtatgaaatttaggggtgatttaagg
acactggggtgatgacagaagatgtgggtgtttctctgtatcctcggccaggtgaagcatcag
ggcctgaacaagaacatcaacctggactctcgggatgggatgccagtggaagcactgatca
gtggagtgagctgaccgagcagagcagactccaagagaacctcaagcttatcgtaccttcc
ttccatcaagctatacataaccttcttccaagctcgtgcttcttgcataaccagatagagga
gttaatgatactcctggaatacaagatcccccgcaatgaggctgatgggatgctattaatg
ttggagatgggtgtctctttgagaagaagctgtggggcctaaagggtgctgcaggagctttca
cagtgagcagtaaggtccatccatgaccttctgttctatttctctcatcagactgggatccc
agcacgtgggagccattatattgctaacaacaagaaaatgtag (SEQ ID NO: 33)
```

15 p544 empalmado y traducido, incluyendo el péptido señal

```
mksvwvifflmavvtgvnsaftespltphrdicsrsiwlarkirsdltalesyvkhggl
nkninldsadgmpvastdqwselteaerlqenlqayrtfhvllarllledqqvhftptegdfh
qaihtlllqvaafayqieelmilleykiprneadgmpinvgdgglfekklwglkvlqelsqw
tvrsihdlrfisshqtgipargshyiannkkm (SEQ ID NO:34)
```

Tabla 7. Producción de proteínas 544 CNTF y 834 a partir de líneas celulares derivadas de transfecciones iterativas.

Línea celular	CNTF PCD	PCD 834
544(834-10-5)-1-1	0,200	15,02
544(834-10-5)-1-3	0,594	21,14
544(834-10-5)-1-9	0,410	15,32
544(834-10-5)-1-35	0,401	14,57
544(834-10-5)-1-38	0,457	18,62
544(834-10-5)-1-41	0,380	14,12
544(834-10-5)-1-44	0,360	14,47
544(834-10-5)-1-46	0,424	15,98

Ejemplo 10: Antagonistas de PDGFR solubles

5 Una terapia combinatoria ECT de molécula dual puede estar dirigida a la angiogénesis, por ejemplo por dispositivos
dobles que secretan factores anti-angiogénicos separados, o una línea celular de combinación secretora de dos
moléculas diferentes. Por ejemplo, líneas celulares antagonistas de la estructura de anticuerpos anti-angiogénica y/o
PDGFR soluble se construyeron utilizando los plásmidos p963, p964, p974, p978, p977 y, cada una de las cuales
10 codifican PDGFRbeta ya sea como un receptor soluble o como una proteína de fusión soluble. Un ELISA específico
de PDGFRbeta fue desarrollado en el que el anticuerpo de captura era anti-Fc y el anticuerpo de detección fue un
anticuerpo Beta anti-PDGFR (Figura 10), lo que muestra que la transfección transitoria de células NTC-200 produce
material inmunogénico que corresponde a la estructura predicha de p963 PDGFR-IgG1 Fc, y p964 PDGFR-IgG4 Fc.

Ejemplo 11: Líneas celulares productoras de PDGFR-Fc

15 Utilizando un enfoque similar al de la generación del antagonista VEGF de la producción de líneas celulares
mencionadas en los ejemplos anteriores, también se han generado líneas celulares que producían el antagonista
PDGFR. Como se muestra en la Tabla 8, la selección clonal de p963 resultó en el clon 963G2 con una tasa de
producción de 7,7 pcd. Una manipulación posterior de 963G2 mediante transfección iterativa se puede utilizar para
aumentar la tasa de producción de la proteína P963.

Tabla 8 Líneas celulares productoras de PDGFR-IgG1 Fc

Línea celular	PCD PDGFR-IgG1 Fc
963G2	7,73
963G4	3,54
963E7	1,62

20 Ejemplo 12: Otras estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas en ECT, y la influencia del medio en la producción
del dispositivo

Además del antagonista 834-10-5 VEGFR-Fc, se obtuvieron otras líneas celulares a partir de una única transfección
y selección clonal. Como se muestra en un ejemplo en la Figura 12, se generaron las líneas celulares que
25 representan el anticuerpo monoclonal (Mab - P874), el fragmento Fab (Fab - P915), Fv de cadena sencilla (ScFv -
P918) y VEGFR-Fc (receptor-Fc - P834) que producían entre 8 pcd y 35 pcd (Mab). Cuando se colocaban en el
formato del dispositivo ECT, se observaba un amplio intervalo de producción de proteínas recombinantes, que era
dependiente de la línea celular utilizada. También se observó que los medios jugaban un papel importante en la
secreción de proteínas, basado en el medio DMEM 10% FBS y medio sin suero endotelial (Endo Gibco) analizados.

30 Como se ve en los dispositivos del receptor Fc 834-10-5 y dispositivos Fab 913-9-45 se mide poca diferencia en la
producción del dispositivo según el cultivo, ya sea endo o DMEM FBS al 10%. Sin embargo, los dispositivos ScFv
918-4-35 y Mab 874-1-23 eran muy sensibles al cultivo en Endo, y dieron los resultados máximos cuando se
cultivaron en DMEM FBS al 10%, hasta 3 µg/día/dispositivo para Mab.

Estos resultados sugieren que el acondicionamiento del dispositivo con el medio apropiado puede ser necesario para optimizar las células antes de la implantación en el huésped, permitiendo de ese modo una velocidad de producción máxima y capacidad de supervivencia.

- 5 Por ejemplo, los dispositivos 874-1-23 se acondicionaron en DMEM 10% de FBS durante 4 semanas antes de la implantación en los ojos de conejo. Los conejos fueron enucleados un mes después de la implantación y los niveles vítreos de las proteínas 874 Mab se evaluaron por ELISA VEGF-Fc y también por Fc- ELISA. Como se ve en la Tabla 9, entre 400 ng/ml y hasta 1,7 µg/ml de proteína 874 Mab se detectó en vítreo de conejo implantado con el dispositivo de ECT.

Tabla 9 Producción de TEC 874 Mab anti-VEGF en vítreo de conejo y explantes

Nº Ojo	Vítreo ng/ml vit	Explante ng/dispositivo/día
19	1710	950
20	663	526
21	412	670
22	615	728

- 10 Además, se evaluaron dispositivos 874-1-23 ECT para la producción de Mab en la configuración sistémica con ratones SCID. Aunque 874 es un anticuerpo anti-VEGF, su especificidad se ha informado que es contra VEGF humano, y no en VEGF de roedores. Por lo tanto, la función de angiogénica anti-humana de esta molécula se infiere que no tiene efectos fisiológicos adversos en un modelo de ratón SCID. Para cada ratón, cuatro dispositivos 874-1-23 ECT se cultivaron en DMEM 10% de FBS previo a la implantación por vía subcutánea en el dorso de ratones SCID, con un total de 6 ratones ensayados. Después de un mes, se extrajo suero de ratón por punción cardiaca, y la concentración sérica de la proteína 874 se evaluó por ELISA VEGF-Fc.

Tabla 10. Acumulación de la proteína 874 Mab en suero de ratón SCID

Ratón	Niveles en suero de Mab 874 ng/ml
Nº 1	4182
Nº 2	18770
Nº 3	19172
Nº 4	15182
Nº 5	2995
Nº 6	839
Nº 7 control	0

- 20 Por lo tanto, como se ve en la Tabla 10, los implantes 874-1-23 ECT fueron capaces de producir hasta 19 µg/ml en estado estacionario, de 874 Mab, medido por la unión directa de ELISA VEGF - Fc. El examen histológico de estas secciones del dispositivo ECT junto con los tejidos adherentes mostró numerosas vascularizaciones recién desarrolladas en estrecha proximidad con el implante.

- 25 La vascularización de la superficie del dispositivo ECT se consiguió y permitió la absorción por difusión de la proteína recombinante y el transporte en el sistema circulatorio del animal.

Equivalentes

- 30 Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en la descripción adjunta anterior. Aunque cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen ahora los métodos y materiales preferidos. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y de las reivindicaciones. En la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares incluyen a los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se defina lo contrario, todos los términos

técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente cualquier experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención.

La descripción precedente se ha presentado solamente con fines de ilustración y no se pretende que limite la invención a la forma precisa descrita, sino por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una línea celular que comprende:
 - 5 a. una célula ARPE- 19 genéticamente modificada que produce una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas, en donde las una o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas se introducen en la célula ARPE-19 por al menos una transfección, en el que la transfección comprende una transfección, dos transfecciones, o tres transfecciones, y en donde la una o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas se codifican por una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 o tiene una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:2; o
 - 10 b. una célula ARPE-19 modificada por ingeniería genética que produce una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz es al menos 10.000 ng/día/10⁶ células y en donde las una o más estructuras anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas se codifican por una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, o tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2.
- 15 2. Un dispositivo de cultivo celular implantable, comprendiendo el dispositivo:
 - a. un núcleo que comprende la línea celular de la reivindicación 1; y
 - b. una membrana semi-permeable que rodea a la línea celular o la célula, en el que la membrana permite la difusión de las una o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas a su través.
- 20 3. El dispositivo de la reivindicación 2, en el que el núcleo comprende además una matriz dispuesta dentro de la membrana semi-permeable.
4. El dispositivo de la reivindicación 13, en el que la matriz comprende una pluralidad de monofilamentos, en el que dichos monofilamentos están:
 - a. enrollados en un hilo o tejido en una malla o
 - 25 b. enrollados en un hilo que se encuentra en soportes no tejidos,
 y en el que las células se distribuyen sobre el mismo.
5. El dispositivo de la reivindicación 4, en el que los monofilamentos comprenden un material biocompatible seleccionado del grupo que consiste en acrílico, poliéster, polietileno, polipropileno, poliacetonitrilo, tereftalato de polietileno, nylon, poliamidas, poliuretanos, polibutéster, seda, algodón, quitina, carbono y metales biocompatibles.
- 30 6. El dispositivo de la reivindicación 5, en el que los monofilamentos comprenden fibras de tereftalato de polietileno (PET) que comprende entre 40 y 85% del volumen interno del dispositivo.
7. El dispositivo de la reivindicación 2, en el que el dispositivo comprende además un anclaje de fijación.
8. El dispositivo de la reivindicación 7, en el que el anclaje de fijación comprende un bucle de anclaje.
- 35 9. El dispositivo de la reivindicación 8, en el que el bucle de anclaje está adaptado para anclar el dispositivo a una estructura ocular.
10. El dispositivo de la reivindicación 2, en el que el dispositivo se implanta en el ojo u otra región diana seleccionada del grupo que consiste en bazo, oído, corazón, colon, hígado, riñón, mama, articulaciones, médula ósea, espacios subcutáneos y peritoneales.
- 40 11. El dispositivo de la reivindicación 10, en el que el dispositivo se implanta en el vítreo, el humor acuoso, el espacio de la subtenoniana, el espacio periocular, la cámara posterior, o la cámara anterior del ojo.
12. El dispositivo de la reivindicación 2, en el que la membrana semi-permeable comprende:
 - una membrana de permeabilidad selectiva inmunoprotectora; o
 - una membrana de ultrafiltración o una membrana de microfiltración.
- 45 13. El dispositivo de la reivindicación 12, en el que la membrana semi-permeable tiene un tamaño medio de poro de 100 nm.
14. El dispositivo de la reivindicación 2, en el que la membrana semi-permeable comprende un material de membrana no porosa.

15. El dispositivo de la reivindicación 14, en el que el material de la membrana no porosa es un hidrogel o un poliuretano.
16. El dispositivo de la reivindicación 2, en el que al menos una molécula biológicamente activa adicional es co-suministrada desde el dispositivo.
- 5 17. El dispositivo de la reivindicación 16, en el que la al menos una molécula biológicamente activa adicional es de una fuente no celular o de una fuente celular.
18. El dispositivo de la reivindicación 17, en el que la al menos una molécula biológicamente activa adicional es producida por una o más células ARPE-19 modificadas por ingeniería genética en el núcleo.
- 10 19. El dispositivo de la reivindicación 2, que comprende además una o más características adicionales seleccionadas del grupo que consiste en:
- a. el núcleo comprende entre $0,5-1,0 \times 10^6$ células ARPE-19;
 - b. la longitud del dispositivo está entre 4 mm- 11 mm;
 - c. el diámetro interno del dispositivo está entre 0,9 mm -1,2 mm;
 - d. los extremos del dispositivo se sellan utilizando metacrilato de metilo;
 - 15 e. la membrana semi-permeable tiene un tamaño medio de poro de aproximadamente 100 nm;
 - f. el punto de corte del peso molecular nominal (MWCO) de la semi-permeable membrana es 500 KD;
 - g. la membrana semi-permeable está entre 90-120 μm de espesor;
 - h. el núcleo comprende una estructura interno, en el que la estructura comprende fibras de tereftalato de polietileno (PET) que comprenden entre 40 y 85% del volumen interno del dispositivo; y
 - 20 i. combinaciones de los mismos.
20. El dispositivo de la reivindicación 19, en el que el dispositivo comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, o la totalidad de las características adicionales.
21. El dispositivo de la reivindicación 2 para suministrar una dosis terapéutica apropiada de las una o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas a un ojo de un sujeto, en el que la dosis terapéutica es al menos 100 ng/día/ojo.
- 25 22. El dispositivo de cultivo celular implantable de la reivindicación 2 para uso en un método para el tratamiento de trastornos oftálmicos, mediante el cual el método comprende implantar el dicho dispositivo de cultivo celular implantable de la reivindicación 2 en el ojo de un paciente y permitir que las una o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas se difundan desde el dispositivo y se unan a VEGF, PDGF, o ambos VEGF y PDGF en el ojo.
- 30 23. El dispositivo para uso de acuerdo con la reivindicación 22, en el que el trastorno oftálmico se selecciona del grupo que consiste en retinopatía del prematuro, edema macular diabético, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma, retinitis pigmentosa, formación de cataratas, retinoblastoma e isquemia retiniana.
- 35 24. El dispositivo para uso de acuerdo con la reivindicación 23, en el que la degeneración macular relacionada con la edad es la forma húmeda de la degeneración macular relacionada con la edad.
25. El dispositivo para uso de acuerdo con la reivindicación 23, en el que el trastorno oftálmico es la retinopatía diabética.
- 40 26. El dispositivo para uso de acuerdo con la reivindicación 22, en el que entre 0,1 pg y 1000 μg por ojo por paciente por día de la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o la molécula anti-angiogénica se difunden desde el dispositivo.
- 45 27. El dispositivo de cultivo celular implantable de la reivindicación 2 para uso en un método de tratamiento de un trastorno de proliferación celular o para la inhibición de la proliferación de células endoteliales o la vascularización, por medio del cual el método comprende implantar el dicho dispositivo de cultivo celular implantable de la reivindicación 2 en el paciente y permitir que las una o más estructuras de anticuerpos anti-angiogénicas o moléculas anti-angiogénicas se difundan desde el dispositivo.

28. El dispositivo para uso de acuerdo con la reivindicación 27, en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en trastornos hematológicos, aterosclerosis, inflamación, aumento de la permeabilidad vascular y malignidad.
- 5 29. El dispositivo para uso de acuerdo con la reivindicación 27, en el que una cantidad terapéuticamente eficaz por paciente por día de la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o la molécula anti-angiogénica se difunde desde el dispositivo.
30. El dispositivo de cultivo celular implantable de la reivindicación 2, en el que el dispositivo es para la implantación en una región diana de un paciente, tal que las una o más células ARPE- 19 encapsuladas secretan la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o la molécula anti-angiogénica en la región diana.
- 10 31. El dispositivo para uso de acuerdo con la reivindicación 30, en el que la región diana se selecciona de entre el grupo que consiste en el sistema nervioso central, incluyendo cerebro, ventrículo, médula espinal, humores acuoso y vítreo del ojo, bazo, oído, corazón, colon, hígado, riñón, mama, articulaciones, médula ósea, espacios subcutáneos y peritoneales.
- 15 32. El dispositivo para uso de acuerdo con la reivindicación 30, en el que una cantidad terapéuticamente eficaz por paciente por día de la estructura de anticuerpos anti-angiogénica o la molécula anti-angiogénica se difunde en la región diana.

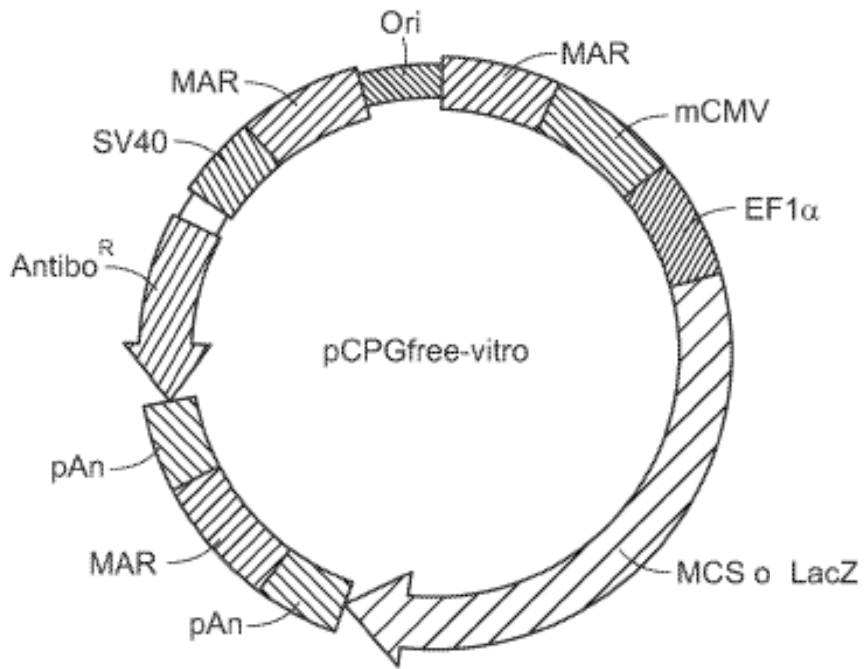
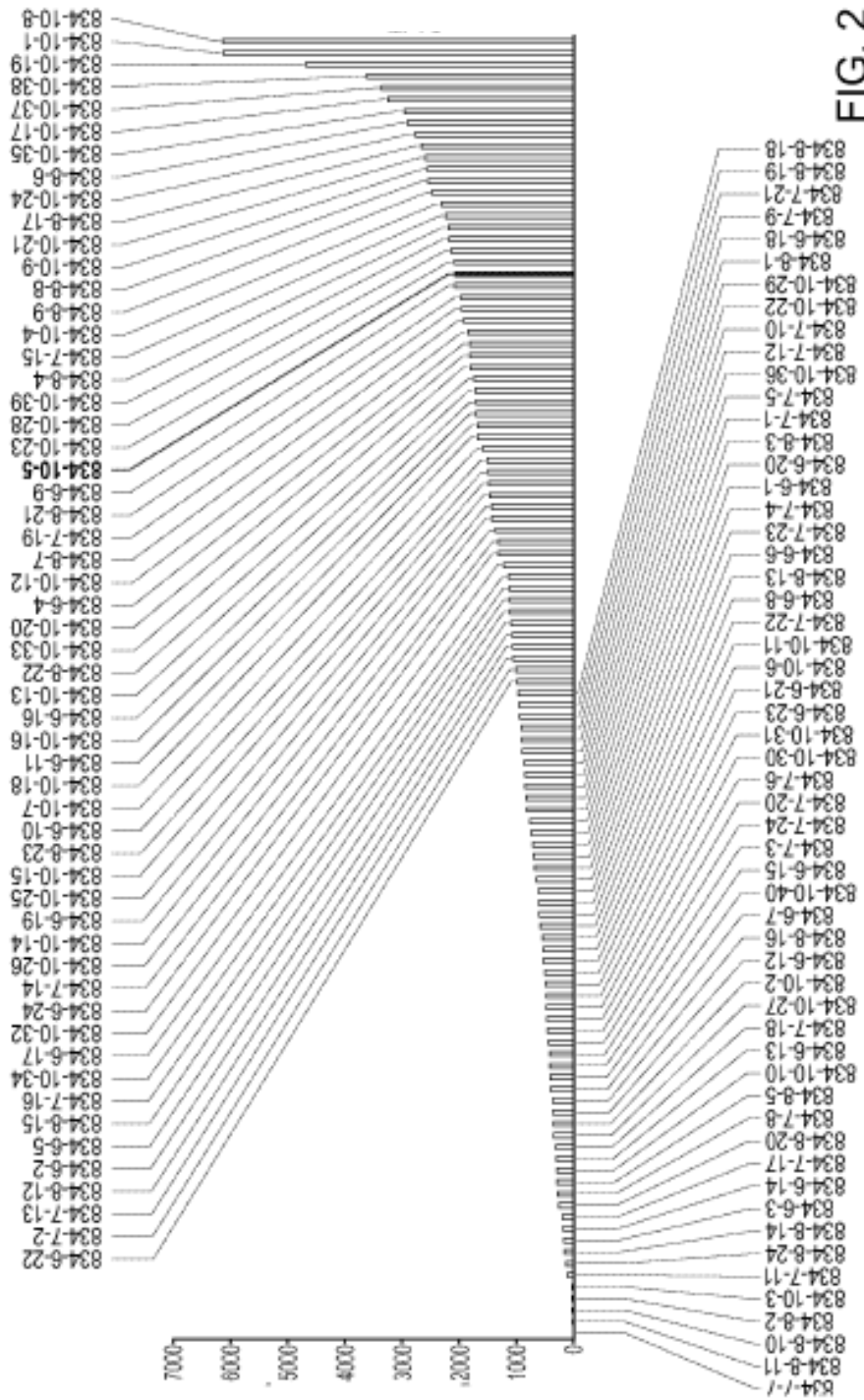


Diagrama del vector de expresión pCpGfree

FIG. 1



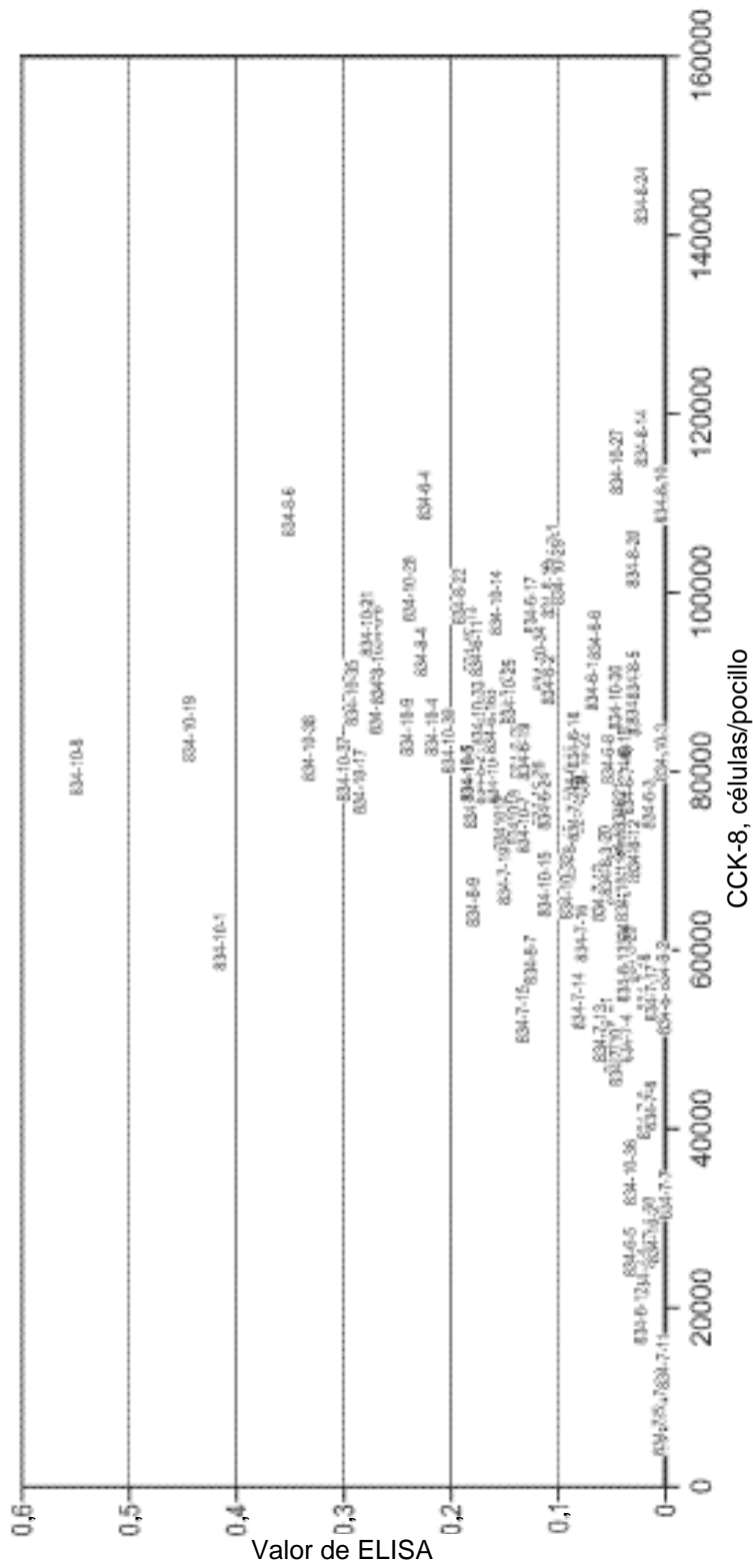


FIG. 2 Cont.

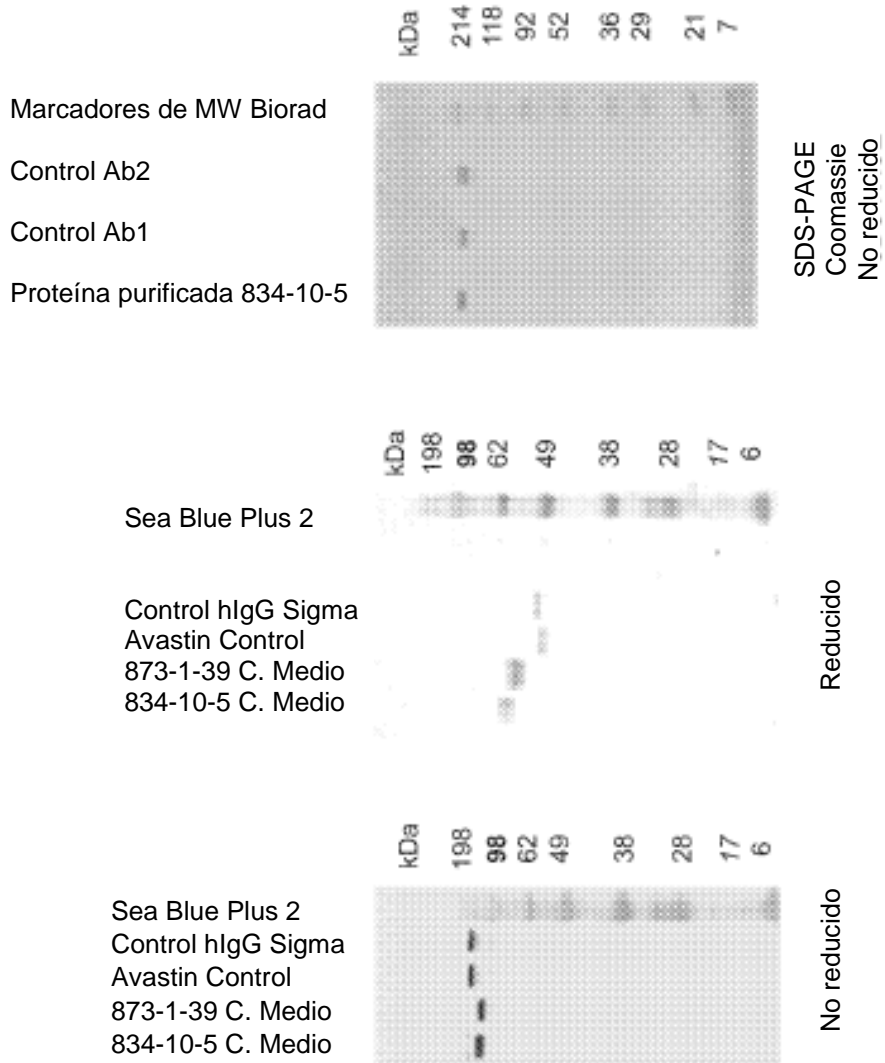


FIG. 3

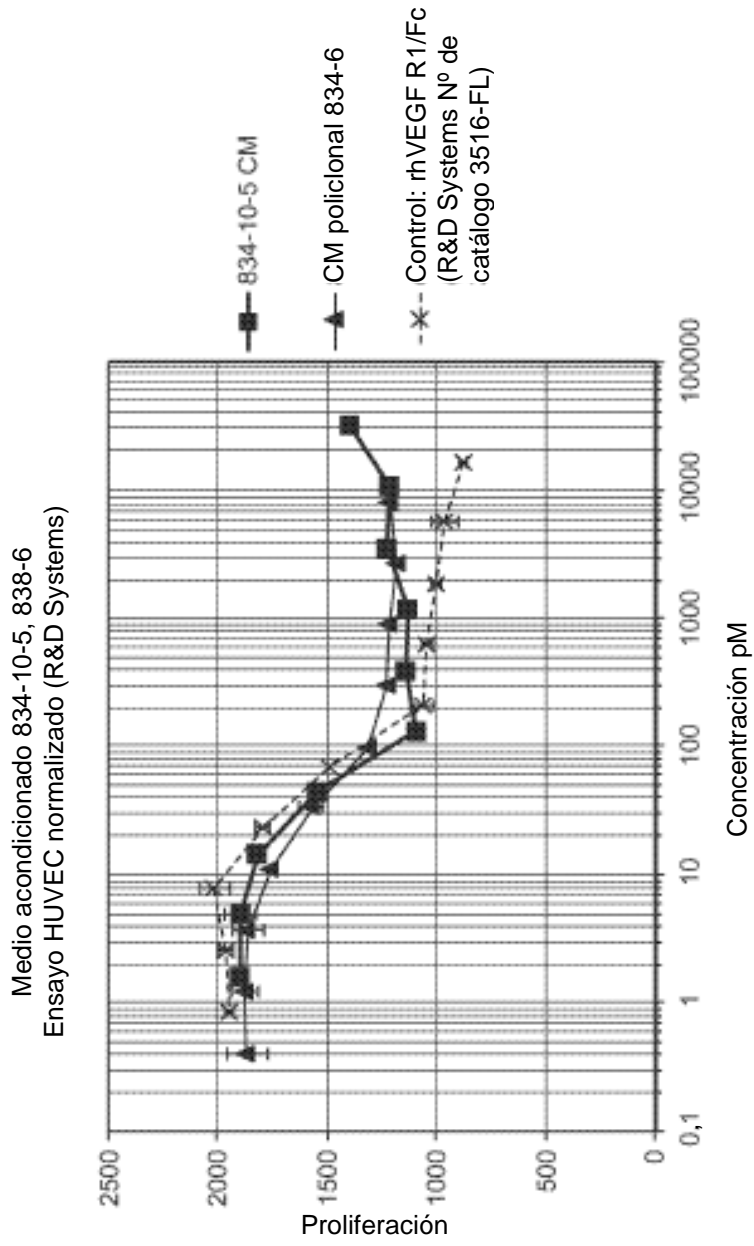


FIG. 4

Unión de solución 834-10-5

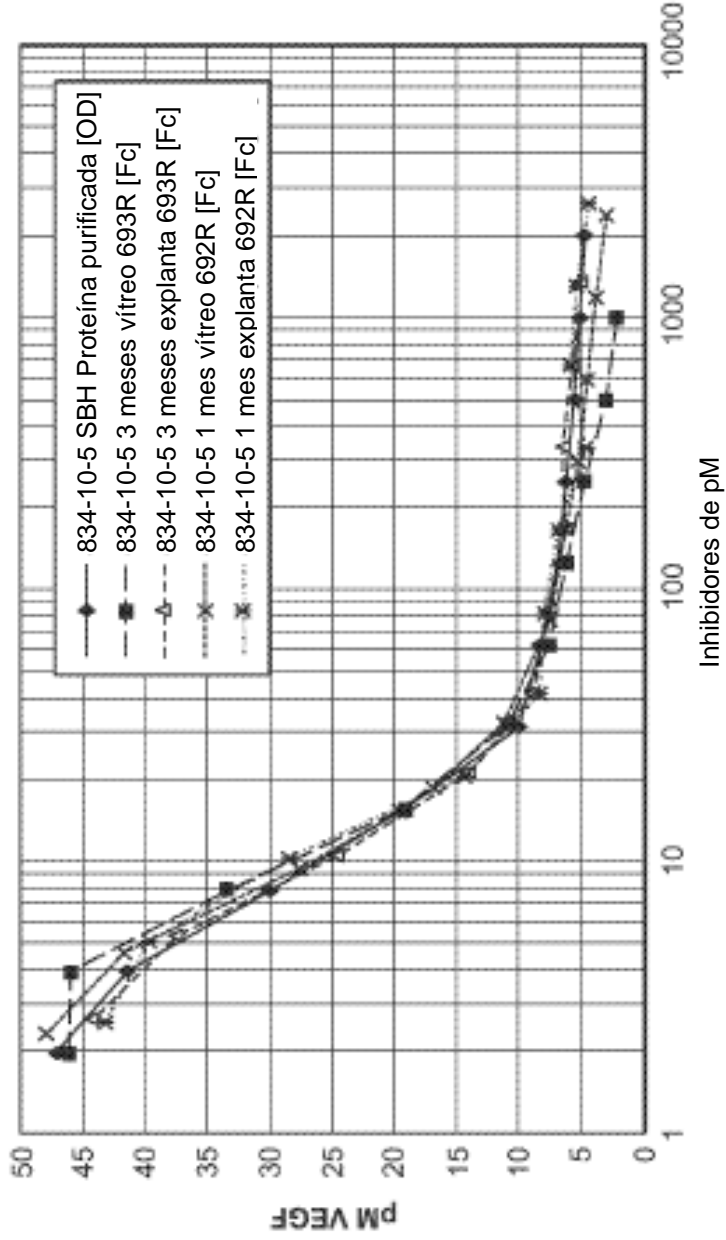


FIG. 5

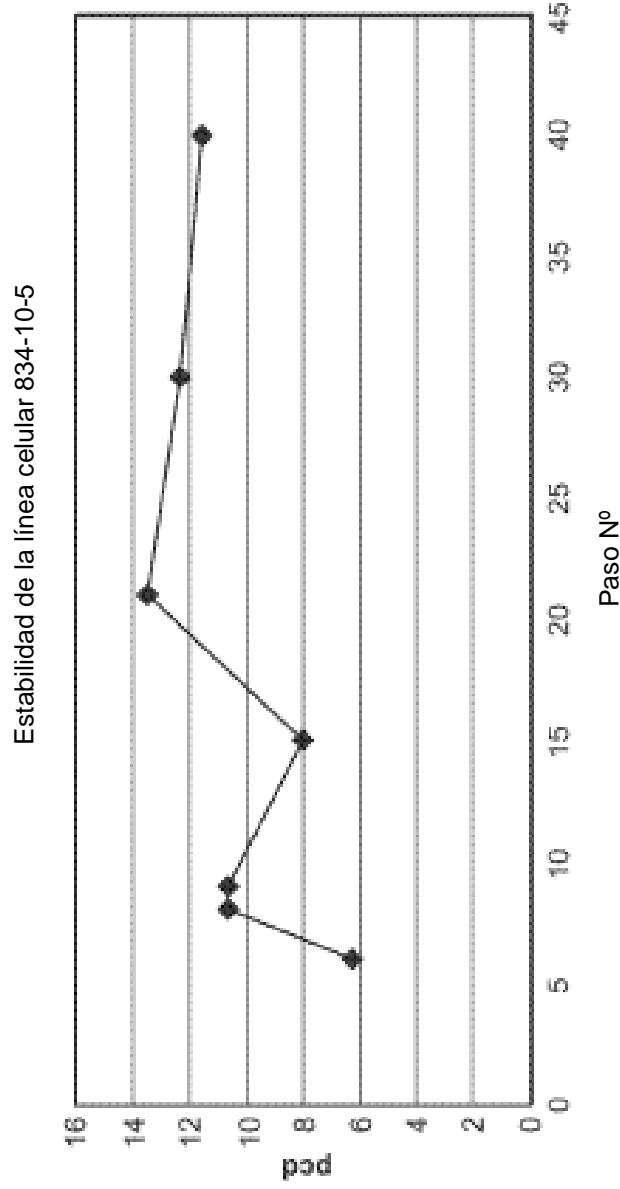


FIG. 6

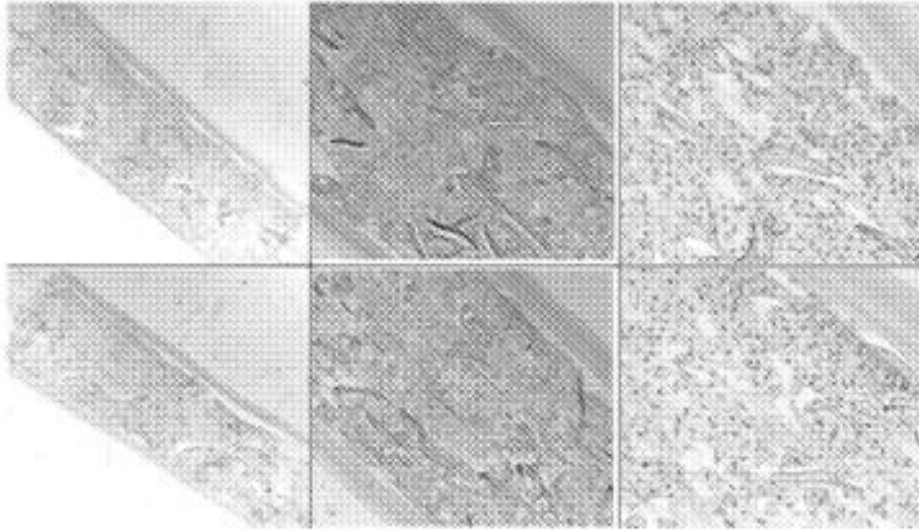


FIG. 7

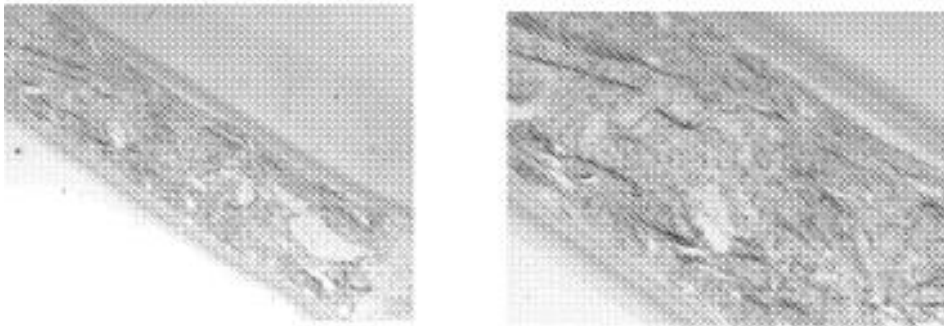


FIG. 8

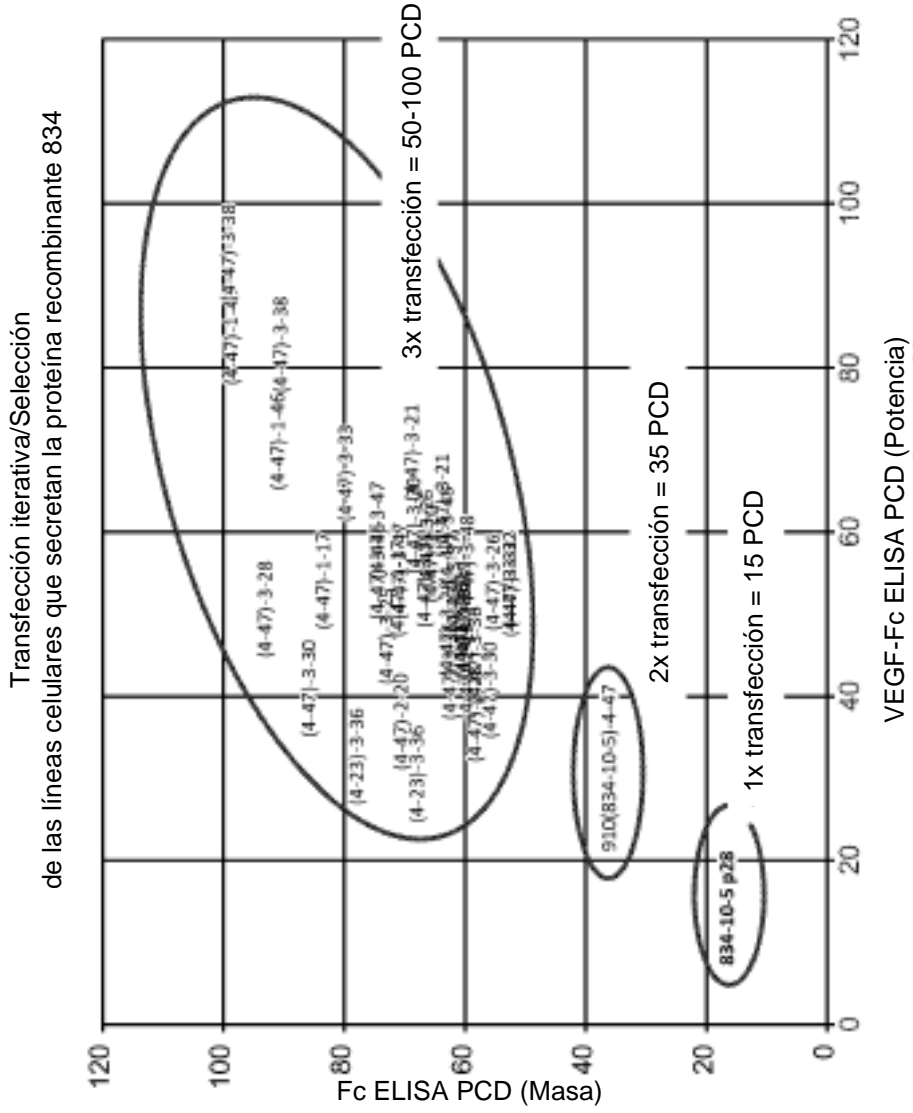


FIG. 9

ELISA PDGFR Beta
 Revestimiento: anti-Fc, Detec.: Péptido anti-PDGFR Beta

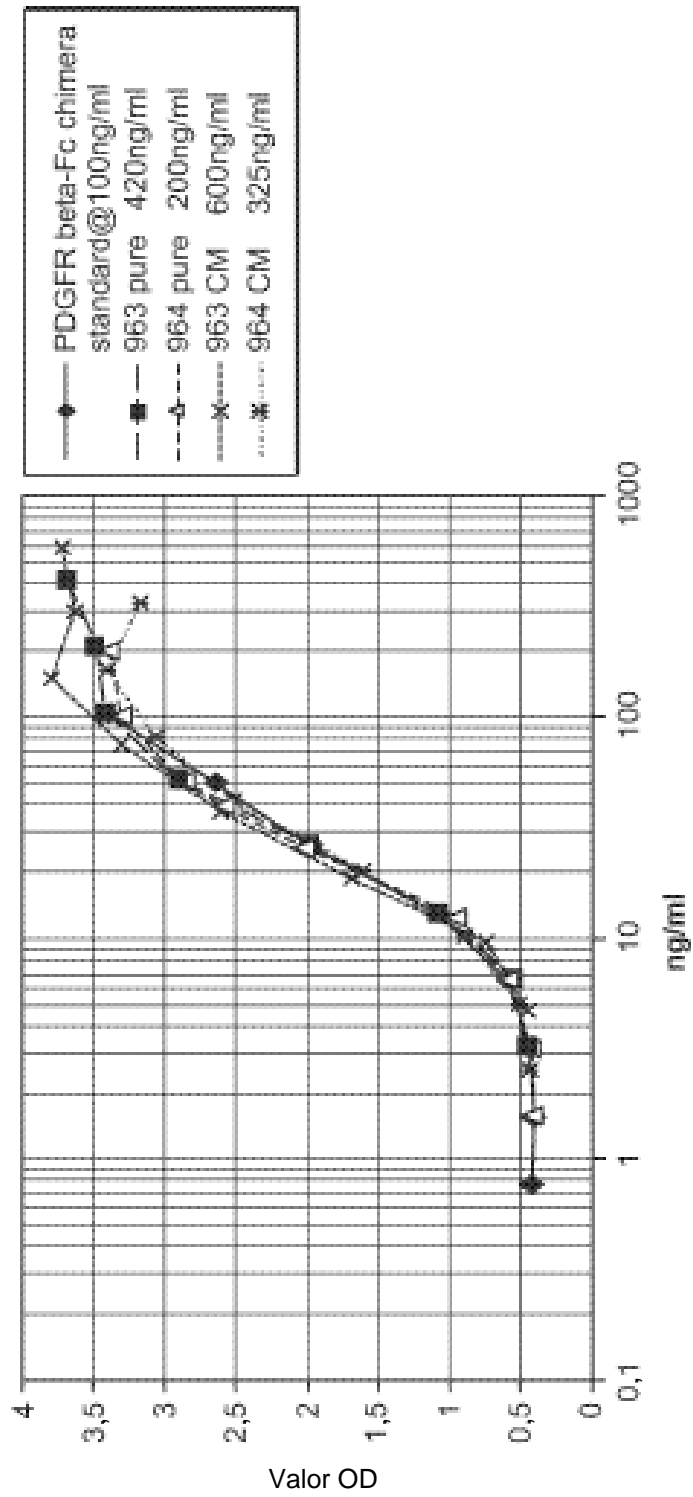


FIG. 10

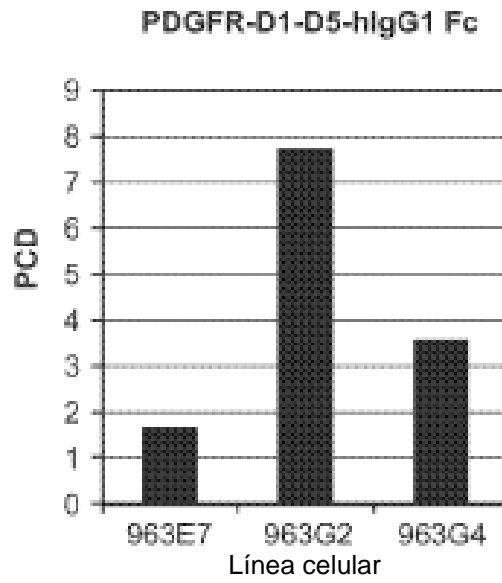


FIG. 11

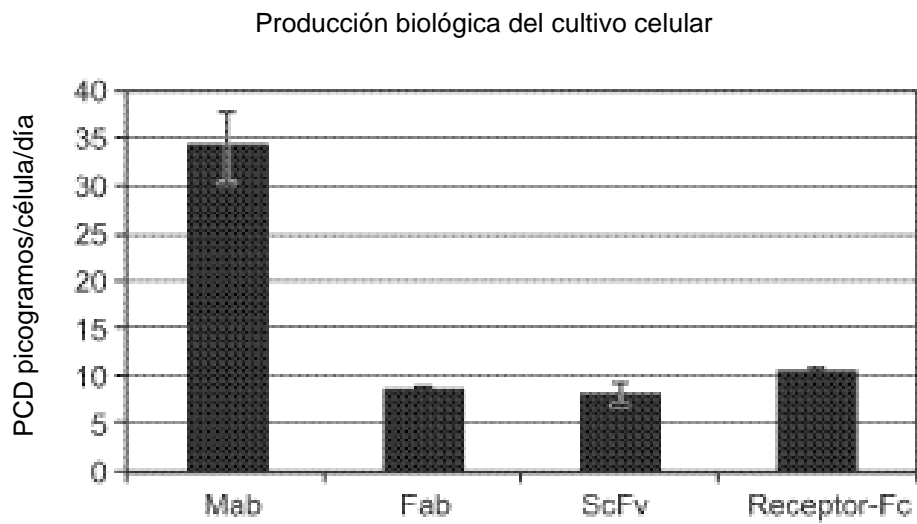


FIG. 12

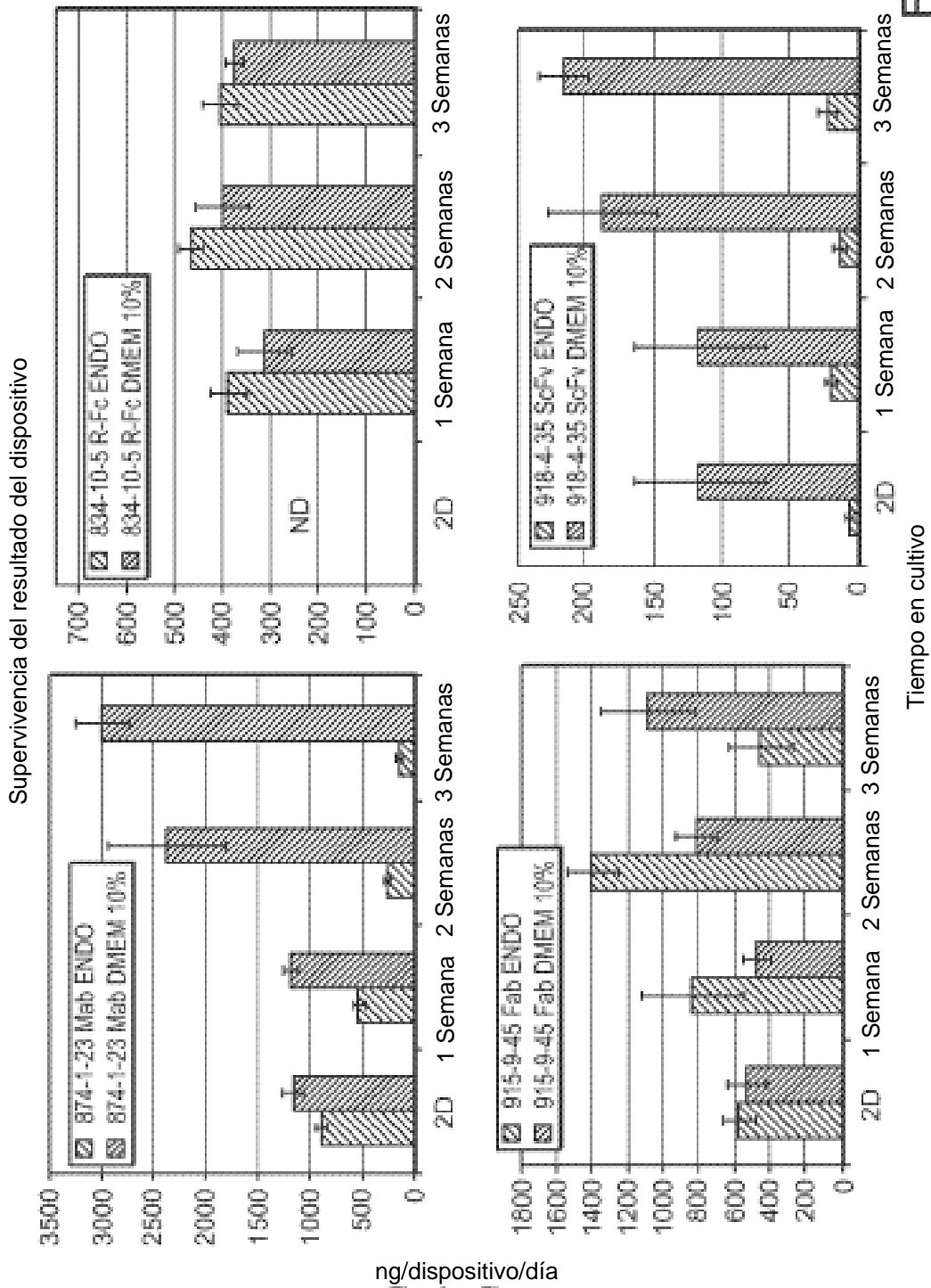


FIG. 13

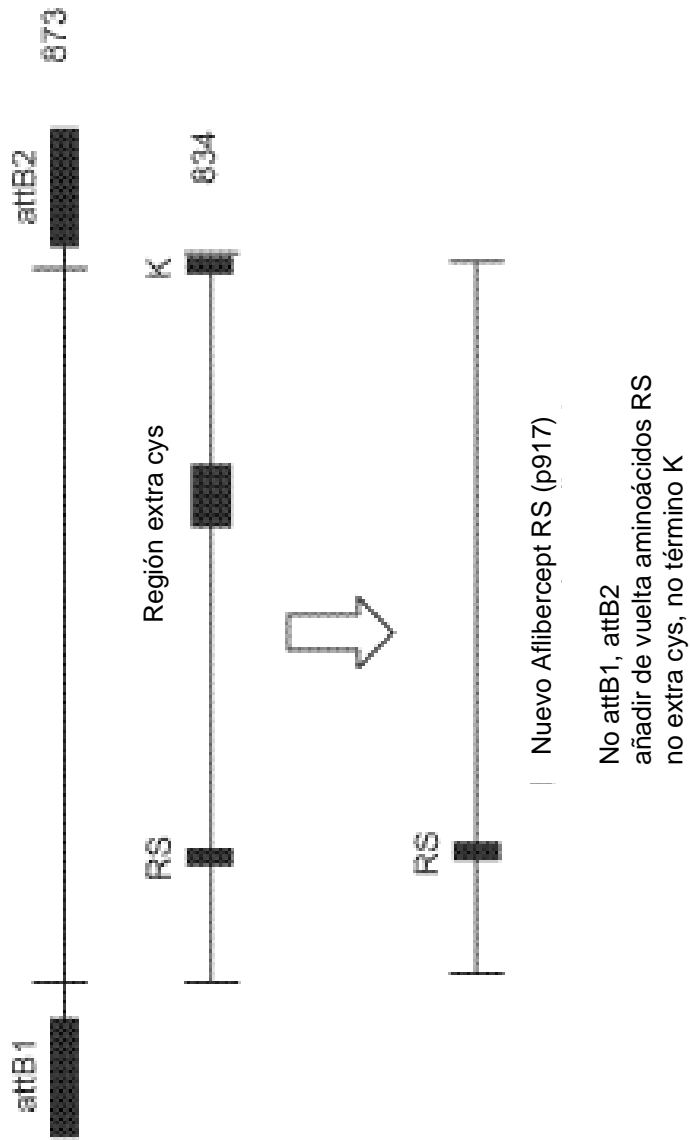


FIG. 14

	Sección 1	
	1 10 20 30 40 50 60	69
Traducción de la secuencia real de p834	(1) MVSYWDTGVLICALLSCLLLTGSSSGSRSDTGRPEVEMYSEIPEIIMTEGRELVI PCRVTSPTNITVIL	
Traducción de p834_afibercept	(1) MVSYWDTGVLICALLSCLLLTGSSSGSDTGRPEVEMYSEIPEIIMTEGRELVI PCRVTSPTNITVIL	
Traducción de afibercept R5	(1) MVSYWDTGVLICALLSCLLLTGSSSGSRSDTGRPEVEMYSEIPEIIMTEGRELVI PCRVTSPTNITVIL	
	Sección 2	
	70 80 90 100 110 120 130	138
Traducción de la secuencia real de p834	(70) KKPPLDTLIPDGKRIIWDNRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTYLTHROINTIIDVVLSPSH	
Traducción de p834_afibercept	(70) KKPPLDTLIPDGKRIIWDNRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTYLTHROINTIIDVVLSPSH	
Traducción de afibercept R5	(70) KKPPLDTLIPDGKRIIWDNRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTYLTHROINTIIDVVLSPSH	
	Sección 3	
	139 140 150 160 170 180 190	207
Traducción de la secuencia real de p834	(139) GIELSVGEKLVNCTARTELNVDGFNWEYPSKHKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFSLTLIDGVTRSD	
Traducción de p834_afibercept	(139) GIELSVGEKLVNCTARTELNVDGFNWEYPSKHKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFSLTLIDGVTRSD	
Traducción de afibercept R5	(139) GIELSVGEKLVNCTARTELNVDGFNWEYPSKHKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFSLTLIDGVTRSD	
	Sección 4	
	208 210 220 230 240 250 260	276
Traducción de la secuencia real de p834	(208) QGLYTCAASSGLMTRKKNSTFVRVHEKLEFEPKSCDKHTTCCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTIMISRT	
Traducción de p834_afibercept	(208) QGLYTCAASSGLMTRKKNSTFVRVHEKLEFEPKSCDKHTTCCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTIMISRT	
Traducción de afibercept R5	(208) QGLYTCAASSGLMTRKKNSTFVRVHEKLEFEPKSCDKHTTCCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTIMISRT	
	Sección 5	
	277 280 290 300 310 320 330	345
Traducción de la secuencia real de p834	(277) PEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYDGVVEVHNAKTKPREEQVNSYRVSVSVTLVHQDWLNGREYKCKVSN	
Traducción de p834_afibercept	(277) PEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYDGVVEVHNAKTKPREEQVNSYRVSVSVTLVHQDWLNGREYKCKVSN	
Traducción de afibercept R5	(277) PEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYDGVVEVHNAKTKPREEQVNSYRVSVSVTLVHQDWLNGREYKCKVSN	
	Sección 6	
	346 350 360 370 380 390 400	414
Traducción de la secuencia real de p834	(346) KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTRKNQVLSLCLVKGFFPSDIAVEMESNGQPENNYKTT	
Traducción de p834_afibercept	(346) KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTRKNQVLSLCLVKGFFPSDIAVEMESNGQPENNYKTT	
Traducción de afibercept R5	(346) KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTRKNQVLSLCLVKGFFPSDIAVEMESNGQPENNYKTT	
	Sección 7	
	415 420 430 440 450 460	467
Traducción de la secuencia real de p834	(415) PPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQGGNVEFSCSVNHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
Traducción de p834_afibercept	(415) PPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQGGNVEFSCSVNHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
Traducción de afibercept R5	(415) PPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQGGNVEFSCSVNHEALHNHYTQKSLSLSPGK	

FIG. 15

	Señal	Dominios del receptor quimérico
	1	100
Aflibercept VEGF-trap WHO	-----SQRDFEVMYSEIPEIIMTSGRELEIIPRVPSNITPLAKFFELIIPDRHIIWGRKAFIISNATK	
VEGFR1R2-FcdeltaC1 del paciente 7531173	MISYVQVGLCALLSCLLIGSSSG--SQRDFEVMYSEIPEIIMTSGRELEIIPRVPSNITPLAKFFELIIPDRHIIWGRKAFIISNATK	
Traducción de la secuencia real de p834	(1) MISYVQVGLCALLSCLLIGSSSGSQRDFEVMYSEIPEIIMTSGRELEIIPRVPSNITPLAKFFELIIPDRHIIWGRKAFIISNATK	200
	101	200
Aflibercept VEGF-trap WHO	ELGLTCEATVWHELITXVILLHRQNTIIDVILSPSGEILSYRKLINVTAKTELAVGLDEWNETFSSECHKHLNWRDLVQSSENRPFLLITLI	
VEGFR1R2-FcdeltaC1 del paciente 7531173	ELGLTCEATVWHELITXVILLHRQNTIIDVILSPSGEILSYRKLINVTAKTELAVGLDEWNETFSSECHKHLNWRDLVQSSENRPFLLITLI	
Traducción de la secuencia real de p834	(73) ELGLTCEATVWHELITXVILLHRQNTIIDVILSPSGEILSYRKLINVTAKTELAVGLDEWNETFSSECHKHLNWRDLVQSSENRPFLLITLI	
	201	300
Aflibercept VEGF-trap WHO	DGVRSDQGLVTCASSGLMKNSTVYVHEK-----DNTETPCPCFAPPELLGSSVLIFFPKNDLMTISRTPEVTCVVVVGSEDFEYKRWYVD	
VEGFR1R2-FcdeltaC1 del paciente 7531173	DGVRSDQGLVTCASSGLMKNSTVYVHEK-----DNTETPCPCFAPPELLGSSVLIFFPKNDLMTISRTPEVTCVVVVGSEDFEYKRWYVD	
Traducción de la secuencia real de p834	(173) DGVRSDQGLVTCASSGLMKNSTVYVHEK-----DNTETPCPCFAPPELLGSSVLIFFPKNDLMTISRTPEVTCVVVVGSEDFEYKRWYVD	
	301	400
Aflibercept VEGF-trap WHO	GVEVHAKATHPREQYHSTTRVSVLIVLEQNLWGRKFKTSNVALPAPIENTISKANGQPREPQVTLPSRDELTRDQVSLTCCVWGFPSDLAVE	
VEGFR1R2-FcdeltaC1 del paciente 7531173	GVEVHAKATHPREQYHSTTRVSVLIVLEQNLWGRKFKTSNVALPAPIENTISKANGQPREPQVTLPSRDELTRDQVSLTCCVWGFPSDLAVE	
Traducción de la secuencia real de p834	(266) GVEVHAKATHPREQYHSTTRVSVLIVLEQNLWGRKFKTSNVALPAPIENTISKANGQPREPQVTLPSRDELTRDQVSLTCCVWGFPSDLAVE	
	401	467
Aflibercept VEGF-trap WHO	RESMAGPEQNTWTPPVLDGSGFFLNSLPTDASHQDGVVTSCSWNEALHNRTYKSLISLSPG-	
VEGFR1R2-FcdeltaC1 del paciente 7531173	RESMAGPEQNTWTPPVLDGSGFFLNSLPTDASHQDGVVTSCSWNEALHNRTYKSLISLSPG-	
Traducción de la secuencia real de p834	(366) RESMAGPEQNTWTPPVLDGSGFFLNSLPTDASHQDGVVTSCSWNEALHNRTYKSLISLSPG-	
	401	467

Dominio Fc

FIG. 16

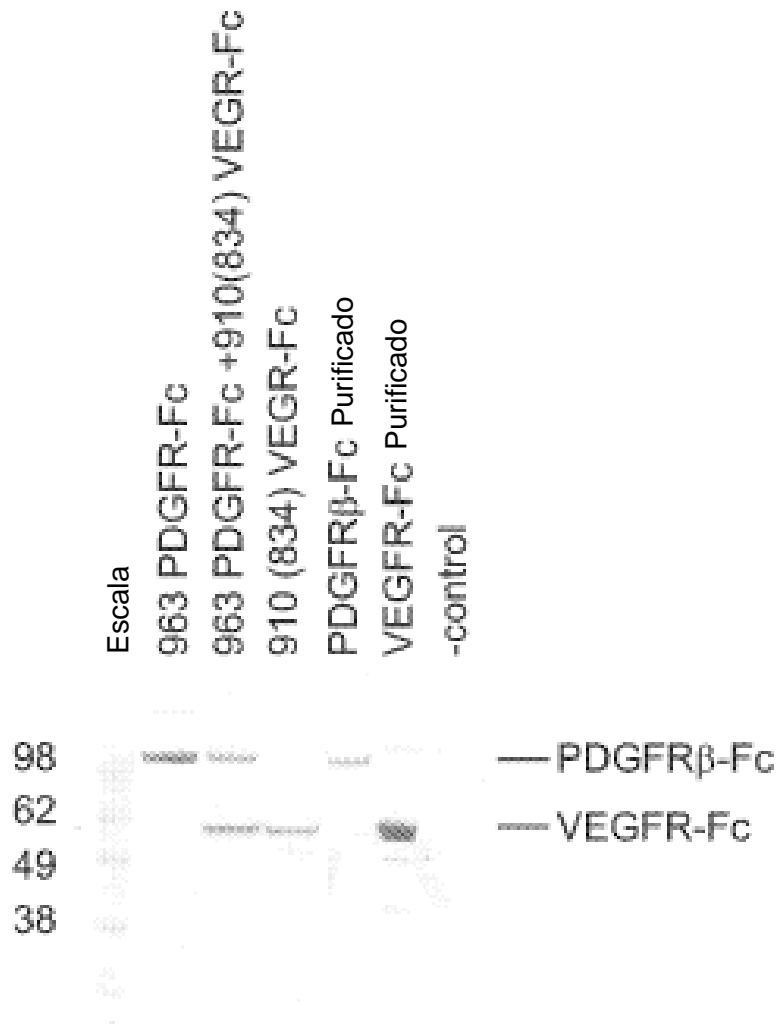


FIG. 17