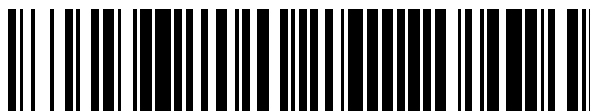


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 007**

51 Int. Cl.:

C07K 14/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2010 E 10716318 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 2421895**

54 Título: **α 1 antitripsina humana recombinante**

30 Prioridad:

23.04.2009 US 214492 P
23.04.2009 EP 09158640

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.02.2016

73 Titular/es:

CRUCCELL HOLLAND B.V. (100.0%)
Archimedesweg 4
2333 CN Leiden, NL

72 Inventor/es:

BRINKMAN, ELISABETH C. M.;
HACK, CORNELIS ERIK y
VAN DEN NIEUWENHOF, INGRID

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 559 007 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

α 1 antitripsina humana recombinante.

5 La invención se refiere al campo de los productos farmacéuticos, en particular a α 1 antitripsina humana recombinante, que puede usarse para, entre otras cosas, la prevención y/o tratamiento del enfisema relacionado con la deficiencia de α 1 antitripsina.

Antecedentes de la invención

10 La α 1-antitripsina (AAT) o α 1-inhibidor de la proteasa (α 1PI) es un inhibidor natural de las proteasas liberadas por los neutrófilos activados. AAT es una glucoproteína que consiste en 394 aminoácidos que tiene un peso molecular de 52 kD. La AAT humana se expresa en forma de un precursor de 418 aminoácidos a partir del cual se corta un precursor de 24 aminoácidos para producir el producto final de 394 aminoácidos. La AAT se sintetiza principalmente en el hígado, pero también se ha demostrado su expresión en neutrófilos, monocitos y macrófagos.

15 Los niveles plasmáticos bajos o a cero de AAT suponen un factor de riesgo para el desarrollo de enfisema debido a la acción sin oposición y destructiva de las proteasas de los neutrófilos en los pulmones. Para la prevención y/o tratamiento del enfisema relacionado con la deficiencia de AAT, se ha desarrollado la terapia de aumento de AAT (Mulgrew et al., 2007).

20 Actualmente, los pacientes con enfisema asociado con la deficiencia de AAT se tratan con una alta dosis de AAT (dp) derivada de plasma (60mg/kg/semana; Prolastin[®] de Talecris, Aralast[®] de Baxter y Zemaira[®] de ZLB). Las grandes cantidades e inyecciones frecuentes de AAT son necesarias para aliviar el enfisema relacionado con la deficiencia de AAT. La mayor preocupación con los materiales procedentes de plasma es la seguridad de las preparaciones. Al igual que con todos los materiales de procedencia humana, el riesgo potencial de la AATdp es la contaminación con priones u otros agentes oportunistas. Una segunda preocupación es la disponibilidad limitada del material plasmático.

30 La AAT procedente de plasma humano contiene tres glucanos enlazados en N en los restos de Asn 46, 83 y 247. Estos glucanos consisten principalmente en estructuras di y trianténarias. Es importante un alto grado de sialilación de los glucanos en las proteínas recombinantes para una farmacocinética óptima (PK).

35 Chang et al. (Journal of Biotechnology 102(1): 61-71, 2003) han descrito la producción de AAT en células de insecto que coexpresan α -2,6-sialiltransferasa para potenciar la maquinaria de N-glucosilación de estas células.

Hasta ahora, la producción recombinante de AAT se ha visto impedida por la baja expresión en la mayoría de plataformas recombinantes (Karnaukhova et al., 2006). La AAT recombinante se ha producido a un alto nivel en sistemas transgénicos, pero el desarrollo clínico de los mismos se ha visto detenido por una farmacocinética (PK) subóptima y por problemas de seguridad debido a contaminantes no humanos (Spencer et al., 2005).

40 Por lo tanto sigue habiendo una necesidad de AAT humana recombinante (AAThr) que sea activa, que pueda obtenerse en cantidades suficientes, y que tenga propiedades farmacocinéticas útiles.

Breve sumario de la invención

45 De acuerdo con la presente invención, se ha demostrado que la α 1-antitripsina humana recombinante (AAThr) que tiene un perfil farmacocinético adecuado puede producirse en grandes cantidades en células PER.C6.

50 En la investigación que condujo a la invención, se generaron líneas celulares que expresan AAT humana y que coexpresan una α -2,3-sialiltransferasa (ST3) o una α -2,6-sialiltransferasa (ST6) en condiciones sin suero. Las líneas celulares fueron capaces de expresar altos niveles de AAThr. Por lo tanto, se lograron rendimientos de hasta 22 picogramos de AAThr por célula por día (pcd). De manera importante, se ha demostrado que la AAThr de la invención es activa como inhibidor de la elastasa de neutrófilos. El análisis de los perfiles de glucanos demostró un buen grado global de protección con ácido siálico. Interesantemente, se observó un aumento en los glucanos tetra-anténarios en la AAThr de la invención, en comparación con la AAT procedente de plasma (Prolastin[®]). Además, la AAThr producida en células que coexpresan ST3 mostró un tiempo medio de residencia (TRM) aumentado en ratas, en comparación con la AAT procedente de plasma. La AAThr producida en células que coexpresan ST6 mostró un tiempo medio de residencia disminuido en comparación con la AAT procedente de plasma.

60 En un aspecto, por lo tanto, la presente invención proporciona una α 1-antitripsina humana recombinante (AAThr) que comprende glucanos unidos en N, en la que:

(a) al menos el 10% de dichos glucanos unidos en N son glucanos tetra-anténarios; y

65 (b) el grado de protección con ácido siálico en dichos glucanos unidos en N (Z/A) es de al menos el 50%, en la que al menos el 50% de la sialilación en dichos glucanos unidos en N es α -2,3-sialilación.

En otra realización, al menos el 20% de dichos glucanos unidos en N son glucanos tetra-anténarios.

En una realización adicional, el grado de protección con ácido siálico en dichos glucanos unidos en N que son tetra-antenarios es de al menos el 30%.

5 En una realización adicional, al menos el 50% de la sialilación en dichos glucanos unidos en N es α -2,3-sialilación. Preferentemente, al menos el 90% de la sialilación en dichos glucanos unidos en N es α -2,3-sialilación.

En un aspecto adicional, la invención proporciona preparaciones y composiciones farmacéuticas que comprenden dicha AATr, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de dicha AATr, a preparaciones y/o a composiciones farmacéuticas que comprenden dicha AATr, para la prevención y/o tratamiento de, entre otras cosas, el enfisema asociado a AAT y/o de enfermedades inflamatorias con daño de tejidos mediado por neutrófilos.

15 En una realización adicional, la invención proporciona un método para producir α 1-antitripsina humana recombinante, que comprende las etapas de proporcionar una célula PER.C6 con un ácido nucleico que codifica α 1-antitripsina humana de tal forma que dicha célula PER.C6 porta dicho ácido nucleico de una manera expresable; y cultivar dicha célula PER.C6 en condiciones que conducen a la producción de dicha AAT humana recombinante, en el que dicha célula PER.C6 se modifica para expresar conjuntamente una α 2,3 sialiltransferasa o α 2,6-sialiltransferasa.

20 Breve descripción de las figuras

FIG. 1. Distribución de frecuencias de las productividades específicas de los cultivos por lotes, tanto para líneas celulares que sobreexpresan α 2,3 sialiltransferasa (A: PER.C6-AAT-ST3) y células que sobreexpresan α 2,6-sialiltransferasa (B: PER.C6-AAT-ST6).

25 FIG. 2. Gel de SDS-PAGE de BIS-Tris al 4-12 % con recogidas de cultivo celular de muestras de PER.C6-AATr (no purificadas), obtenidas con azul coloidal.

FIG. 3. Vista esquemática del ensayo para determinar el grado de sialilación de los glucanos en AAT mediante la proporción Z/A.

30 FIG. 4. Las productividades específicas de las líneas celulares de PER.C6 que expresan AAT no están correlacionadas con el grado de sialilación de los glucanos de PER.C6-AATr (r de Spearman = -0,024, p = 0,893). (○: PER.C6-AAT-ST3; ○: PER.C6-AAT-ST6).

FIG. 5. Sialilación (Fig. 5A) y antenaridad (Fig. 5B) de los glucanos de PER.C6-AATr de muestras negativas a ECL en comparación con los glucanos de PER.C6-AATr de muestras positivas a ECL de FIG y Prolastin®.

35 FIG. 6. Grado de sialilación en todos los glucanos (Fig. 6A) y en los glucanos tetra-antenarios (Fig. 6B) de PER.C6-AATr-ST3 en comparación con los glucanos de PER.C6-AATr-ST6 y Prolastin®.

FIG. 7. Perfiles de concentración plasmática-tiempo para varias dosis de Prolastin® en tampón (PBS/T) o en PER.C6-CM después de la administración en bolo i.v. a ratas. ■: Prolastin® en PER.C6-CM, 50 μ g/kg; ▲: Prolastin® en PER.C6-CM, 100 μ g/kg; ●: Prolastin® en PER.C6-CM, 200 μ g/kg; ○: Prolastin® en PBS/T, 2000 μ g/kg.

40 FIG. 8. Perfiles de concentración plasmática-tiempo para PER.C6-AATr-ST3, PER.C6-AATr-ST6 y Prolastin®. ▲: PER.C6-AATr-ST3, TMR ~ 18-23 h; ■: PER.C6-AATr-ST6, TMR ~ 4-4 h, ●: Prolastin, TMR ~ 11-12 h.

45 FIG. 9. Mapas plasmídicos de los vectores de expresión de AAT pAATopt-ST3 (A) y pAATopt-ST6 (B). CMV = promotor de citomegalovirus, BGHp(A)= secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, f1 ori= origen de replicación de f1, SV40= promotor del virus de simio 40, Neo = marcador de resistencia neomicina, SV40p(A)= secuencia de poliadenilación del virus de simio 40, AAT= alfa₁-antitripsina, ColE1 = origen de replicación de ColE1, Amp = marcador de resistencia a ampicilina, SIAT4C = gen que codifica a ST3=sialiltransferasa IV humana (L23767) (Fig. 9A), SIAT1 = gen que codifica a ST6=sialiltransferasa I humana (NM_003032).

50 Descripción detallada de la invención

La alfa₁-antitripsina (AAT) es un inhibidor natural de las proteasas liberadas por los neutrófilos activados. La AAT se secreta al plasma sanguíneo pero su sitio principal de acción es el parénquima pulmonar. La elastasa de leucocitos humana (HLE), (también conocida como elastasa de neutrófilos humanos (HNE)) es una serín proteasa liberada por los gránulos azurófilos de los neutrófilos como parte de la respuesta inflamatoria normal. En condiciones de homeostasia normales, la AAT sirve como un importante regulador de la proteólisis por la elastasa de leucocitos humana (HLE), evitando de este modo el daño de la matriz alveolar del pulmón. Aparte de HLE, la AAT también inhibe a otras dos proteasas liberadas en los pulmones por los neutrófilos, a saber, catepsina G (catG) y proteasa 3 (Pr3).

60 Se han desarrollado productos de AAT procedentes de plasma y se están usando actualmente para el tratamiento de pacientes que padecen enfisema relacionado con deficiencia de AAT (es decir, que tienen niveles plasmáticos de AAT bajos o a cero), tales como Prolastin®, (Talecris), Aralast® (Baxter) y Zemaira® (ZLB). Generalmente se necesitan altas cantidades (aproximadamente 60 mg/kg/semana) de este producto por paciente. Aparte del enfisema, la AAT también es una terapia (potencial) para enfermedades inflamatorias con daño mediado por neutrófilos.

La producción recombinante de AAT en, por ejemplo, *E. coli* se ha visto impedida por la baja expresión en la mayoría de plataformas recombinantes (Karnaukhova et al., 2006). La AAT recombinante se ha producido a un alto nivel en sistemas transgénicos, pero el desarrollo clínico de los mismos se ha visto detenido por una farmacocinética (PK) subóptima y por problemas de seguridad debido a contaminantes no humanos (Spencer et al., 2005).

La presente invención proporciona ahora una α 1-antitripsina humana recombinante (AAThr) que tiene propiedades farmacocinéticas adecuadas y que puede producirse en grandes cantidades en, por ejemplo, células PER.C6. La AAT recombinante de la presente invención ha demostrado que es funcionalmente activa, tal como se determina por un ensayo cromogénico basado en la inhibición de la elastasa de neutrófilos humana, y que tiene propiedades farmacocinéticas prometedoras, en comparación con los productos de AAT procedentes de plasma, tales como Prolastin®.

Por lo tanto, la presente invención proporciona AAThr que comprende glucanos enlazados en N, en la que

- a) al menos el 10% de dichos glucanos unidos en N son glucanos tetra-antenarios; y
- b) el grado de protección con ácido siálico en dichos glucanos unidos en N (Z/A) es de al menos el 50%, y
- c) en la que al menos el 50% de la sialilación en dichos glucanos unidos en N es α -2,3-sialilación.

Los glucanos unidos en N son cadenas de azúcar que están unidos covalentemente a restos de asparagina de un polipéptido (Varki et al., 1999). El proceso de N-glucosilación comienza con la unión de un precursor de oligosacárido de dolichol al precursor de asparagina. Este precursor se modifica posteriormente en un oligosacárido alto en manosa, híbrido o de tipo complejo. En los azúcares unidos en N de tipo complejo, los restos de manosa unidos tanto en α 3 como en α 6 se sustituyen con restos de N-acetil-glucosamina (GlcNAc). Los N-glucanos de tipo complejo pueden contener de dos a cinco ramas portadoras de GlcNAc que se citan como antenas. La estructura última de los azúcares unidos en N de tipo complejo puede variar en gran medida y dependen de la proteína a la que se unen, sobre la célula hospedadora en las condiciones en las que la célula se cultivan. Las ramas portadoras de GlcNAc pueden modificarse con galactosa (Gal) o con N-acetil-galactosamina (GalNAc) formando las estructuras denominadas LacNAc o LacdiNAc. Asimismo, las ramas portadoras de GlcNAc pueden contener múltiples estructuras de LacNAc que forman las estructuras denominadas de polilactosamina. Las galactosas terminales pueden modificarse con un ácido siálico unido en α 2,3 o en α 2,6 mientras que las N-acetil-galactosaminas terminales solo pueden modificarse con un ácido siálico unido en α 2,6. La adición de ácidos siálicos a Gal terminal o a GalNAc está mediada por sialiltransferasas. Probablemente, el genoma humano codifica más de 20 sialiltransferasas diferentes (Harduin-Lepers et al., 2001). Estas difieren en cuanto a la especificidad de sustrato, distribución en tejido y diversos parámetros bioquímicos.

La AAT nativa tiene tres sitios de glucosilación. Por lo tanto, la AAT comprende tres glucanos unidos en N en los que puede tener lugar la ramificación. Estos glucanos pueden tener 2, 3 o 4 de las denominadas "antenas" o ramas. Sorprendentemente, se ha demostrado que al menos el 10%, preferentemente de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 50%, de dichos glucanos unidos en N de la AAThr de la invención son glucanos tetra-antenarios. En otra realización, al menos el 20 % de dichos glucanos unidos en N son glucanos tetra-antenarios, preferentemente del 20 al 40% de dichos glucanos unidos en N son glucanos tetra-antenarios. De acuerdo con la presente invención, se ha demostrado, sorprendentemente, que el perfil de glucosilación, por ejemplo, en cuanto a la antenaridad, así como las propiedades farmacocinéticas, por ejemplo, el tiempo medio de residencia de la AAThr de la invención difieren de la AAT procedente de plasma, tal como Prolastin®.

Ya que la sialilación completa de los glucanos en proteínas recombinantes es de importancia para unas propiedades farmacocinéticas óptimas, la AAThr de la presente invención se expresa en células PER.C6 en combinación con una sialiltransferasa para lograr isoformas altamente sialiladas de AAThr. Por lo tanto, las células PER.C6 se transfectaron conjuntamente con una α 2,3 sialiltransferasa (PER.C6-ST3) o con una α 2,6 sialiltransferasa (PER.C6-ST6).

De acuerdo con la invención, al menos el 50% de la sialilación total de dichos glucanos unidos en N es una α -2,3-sialilación. Por ejemplo, al menos el 50, el 70 o el 80% de la sialilación en dichos glucanos unidos en N es α -2,3-sialilación. En otra realización más, al menos el 90% de la sialilación en dichos glucanos unidos en N es α -2,3-sialilación. Sorprendentemente, se ha demostrado que en estas realizaciones, la AAThr de la presente invención tiene diferentes propiedades farmacocinéticas, en comparación con la AAT procedente de plasma, tal como Prolastin®, en particular, un tiempo medio de residencia prolongado. Por sialilación se entiende la cantidad de restos de ácido siálico presentes en las estructuras de carbohidrato de AAT: α -2,3-sialilación significa sialilación en la posición 2,3, es decir, un ácido siálico unido en α 2,3 (tal como se conoce en la técnica) y α -2,6-sialilación significa sialilación en la posición 2,6, es decir, un ácido siálico unido en α 2,6 (también conocido en la técnica). Por "al menos el 50% de la sialilación en dichos glucanos unidos en N es α -2,3-sialilación", se entiende entonces que al menos un 50% de los números totales de restos de ácido siálico presentes en la AAThr está sialilada en la posición 2,3.

De acuerdo con la invención, se ha demostrado en estudios PK en ratas que el tiempo medio de residencia (TMR) tanto de AAThr producida por PER.C6-ST3 (AAThr-ST3) como de AAThr producida por PER.C6-ST6 (AAThr-ST6) difiere significativamente del AAT procedente de plasma (Prolastin®). Por lo tanto, se ha demostrado que el TMR en ratas de AAThr-ST3 varía entre aproximadamente 18-23 horas, mientras que el TMR en ratas de Prolastin® es de

aproximadamente 11-12 horas. El uso de AAThr que tiene un TMR prolongado puede, por ejemplo, reducir la dosificación necesaria por paciente. Por el contrario, el TMR en ratas de AAThr-ST6 se reduce en comparación con el de Prolastin® (aproximadamente 3-4 horas). El uso de AAThr-ST6 de la presente invención puede ser ventajoso debido al enlace 2,6 "más natural" del ácido siálico, que corresponde al enlace de ácido siálico en AAT procedente de plasma, tal como Prolastin®. El uso de AAThr-ST6 puede ser ventajoso además en los casos donde un pueda ser beneficioso un TMR reducido.

Como se afirma anteriormente, el grado de sialilación de los glucanos en las proteínas recombinantes para unas propiedades farmacocinéticas óptimas. En una realización preferida, el grado general de protección con ácido siálico en dichos glucanos unidos en N (calculados por la relación Z/A) de la AAThr de la presente invención es, por lo tanto, de al menos el 70%. Más preferentemente, el grado de protección con ácido siálico en dichos glucanos unidos en N (Z/A) es de al menos el 80%, aún más preferentemente, el grado de protección con ácido siálico en dichos glucanos unidos en N (Z/A) es de al menos el 90%.

En una realización adicional, el grado de protección con ácido siálico en dichos glucanos unidos en N que son tetra-antenarios es de al menos el 20%, por ejemplo, entre un 20% y un 65%. Un grado relativamente bajo de sialilación en dichos N-glucanos tetra-antenarios puede producir un producto de AAThr que tenga un TMR reducido, en comparación con la AAT procedente de plasma. En otra realización, el grado de protección con ácido siálico en dichos glucanos unidos en N tetraantenarios es de al menos el 50%, por ejemplo, entre un 50% y un 97%, preferentemente al menos un 60%, más preferentemente entre un 70 y un 95%. El mayor nivel de sialilación en esta realización puede contribuir al TMR prolongado, en comparación con la AAT procedente de plasma.

La invención proporciona además preparaciones y composiciones farmacéuticas que comprenden dicho AAThr y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Por "excipiente farmacéuticamente aceptable" se entiende cualquier sustancia inerte que se combine con una molécula activa (tal como un fármaco, agente, o proteína) para preparar una forma de dosificación adecuada o conveniente. El "excipiente farmacéuticamente aceptable" es un excipiente que no es tóxico para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas y es compatible con otros ingredientes de la formulación que comprenden la molécula activa.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse en varias composiciones para cualquier ruta de administración, bien conocida para el experto en la materia. La selección de la ruta óptima de administración de las composiciones farmacéuticas se verá influenciada por varios factores, incluyendo, por ejemplo, las propiedades fisicoquímicas de las moléculas activas en las composiciones, de la urgencia de la situación clínica y de la relación de las concentraciones plasmáticas de las moléculas activas para el efecto terapéutico deseado. Las preparaciones y composiciones farmacéuticas de la presente invención se formulan preferentemente para administración intravenosa o administración de aerosol. Las formulaciones farmacéuticamente adecuadas de AAThr pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos para el experto en la materia (véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, A.R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990); Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer y L. Hovgaard, Eds., Taylor y Francis (2000); y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edición, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000)).

Típicamente, las composiciones farmacéuticas tienen que ser estériles y estables en condiciones de fabricación y almacenamiento. Las preparaciones y/o composiciones farmacéuticas que comprenden al AAThr de la invención pueden estar en forma de polvo para su reconstitución en el excipiente farmacéuticamente aceptable o en el momento de la administración. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son las técnicas secado al vacío y criodeseccación (liofilización) que producen un polvo del principio activo más cualquier otro ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

Como alternativa, el AAThr de la presente invención puede estar en solución y el excipiente farmacéuticamente aceptable puede añadirse y/o mezclarse antes o en el momento de la administración para proporcionar una forma inyectable de dosis unitaria.

El AAThr, las preparaciones o composiciones farmacéuticas que comprenden dicha AAThr, pueden usarse como medicamentos. El AAThr, las preparaciones y las composiciones farmacéuticas pueden usarse de manera adecuada en la prevención y/o tratamiento de enfermedades y/o trastornos para los que se ha demostrado que la administración de AAT es beneficiosa. Estas pueden, entre otras cosas, usarse en la prevención y/o tratamiento, o una combinación de las mismas, del enfisema asociado con la deficiencia de AAT. El AAThr, las preparaciones o composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden usarse además en la prevención y/o tratamiento del enfisema relacionado con el tabaquismo, la fibrosis quística (FQ), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Ya que se ha descrito que la AAT tiene efectos antiinflamatorios y antiapoptóticos, la AAThr, las preparaciones o las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden usarse como agentes antiinflamatorios. (Lewis et al., 2008; Koulmanda et al., 2008).

En una realización adicional, la invención proporciona un método para producir α 1-antitripsina humana recombinante, que comprende las etapas de proporcionar una célula PER.C6 con un ácido nucleico que codifica α 1-

antitripsina humana de tal forma que dicha célula PER.C6 porta dicho ácido nucleico de una manera expresable; y cultivar dicha célula PER.C6 en condiciones que conducen a la producción de dicha α 1-antitripsina humana recombinante, en el que dicha célula contiene además una secuencia de ácido nucleico que codifica una alfa-2,3-sialiltransferasa, bajo el control de un promotor heterólogo. En una realización, la sialiltransferasa es una sialiltransferasa humana. La AAThr de la presente invención puede, sin embargo, producirse en otras células de mamífero, expresando conjuntamente de manera opcional una sialiltransferasa, tal como, por ejemplo, en células 293.

La invención proporciona un método para producir α 1-antitripsina humana recombinante, que comprende las etapas de proporcionar una célula PER.C6 con un ácido nucleico que codifica α 1-antitripsina humana de tal forma que dicha célula PER.C6 porta dicho ácido nucleico de un formato expresable, en el que dicha célula contiene además una secuencia de ácido nucleico que codifica una alfa-2,3-sialiltransferasa, bajo el control de un promotor heterólogo; cultivar dicha célula PER.C6 en un medio sin suero y permitiendo la expresión de dicha α 1-antitripsina humana en dicha célula; recoger la α 1-antitripsina humana expresada a partir de dicha célula y/o a partir de dicho medio de cultivo; y opcionalmente purificar dicha α 1-antitripsina humana.

El uso de células PER.C6 como plataforma de producción para proteínas de interés se ha descrito en el documento WO 00/63403 cuya divulgación se incorpora al presente documento por referencia. Tal como se muestra en el documento WO 00/63403, las células PER.C6 pueden usarse de manera adecuada para la producción de proteínas recombinantes. Para lograr la producción a gran escala (continua) de proteínas recombinantes mediante cultivo celular, se prefiere tener células capaces de crecer sin la necesidad de anclaje. Las células de la presente invención tienen esa capacidad. Una célula PER.C6 de acuerdo con la presente invención es una célula de un pase aguas arriba o aguas abajo o un descendiente de un pase aguas arriba o aguas abajo de células depositadas en el Center for Applied Microbiology and Research & European Collection of Cell Cultures (ECACC) el 29 de febrero de 2006 con el n.º de ECACC 96022940 (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.994.128). El uso de células PER.C6 para procesos industriales se ha descrito de manera exhaustiva, por ejemplo, en Nichols et al., 2002, y más en particular para la producción de proteínas recombinantes, por ejemplo, en Yallop et al., 2005a y 2005b.

Las células de acuerdo con la invención, en particular las células PER.C6, tienen una ventaja adicional en tanto que pueden cultivarse en ausencia de suero de procedencia animal o humana o componentes séricos de procedencia animal o humana. Este aislamiento es más fácil, mientras que se potencia la seguridad debido a la ausencia de proteínas humanas o animales adicionales en el cultivo, y el sistema es muy fiable (los medios sintéticos son los mejores para la reproducibilidad). Además, la presencia de la región temprana 1A ("E1A") de adenovirus añade otro nivel de ventajas en comparación con líneas celulares (humanas) que carecen de este gen particular. E1A, como activador transcripcional, se conoce para potenciar la transcripción a partir del potenciador/promotor de los genes tempranos inmediatos de CMV (Olive et al., 1990, Gorman et al., 1989). Cuando la proteína recombinante que se va a producir se encuentra bajo el control del potenciador/promotor de CMV, los niveles de expresión aumentan en las células y no en las células que carecen de E1A.

En general, la producción de una proteína recombinante, tal como AAThr, en una célula hospedadora, tal como una célula PER.C6, comprende la introducción de ácido nucleico en un formato expresable en la célula hospedadora, cultivar las células en condiciones que dan lugar a la expresión del ácido nucleico y permitiendo la expresión de dicho ácido nucleico en dichas células. Como alternativa, una proteína que se exprese de manera natural en células hospedadoras deseadas, pero no a niveles suficientes, puede expresarse a niveles aumentados introduciendo secuencias de regulación adecuadas, tales como un promotor fuerte en asociación operativa con el gen deseado (véase, por ejemplo, el documento WO 99/05268, donde el gen EPO endógeno se sobreexpresa mediante la introducción de un promotor fuerte cadena arriba del gen en células humanas).

El ácido nucleico que codifica AAT en formato expresable puede estar en forma de un casete de expresión, y normalmente necesita secuencias capaces de proporcionar la expresión del ácido nucleico, tales como potenciadores, promotor, señal de poliadenilación, y similares. Pueden usarse varios promotores para la expresión de un ácido nucleico recombinante, y estos pueden comprender promotores virales, de mamífero, sintéticos y similares. En determinadas realizaciones, un promotor que dirige la expresión del ácido nucleico de interés es el promotor temprano inmediato de CMV, que comprende por ejemplo los nucleótidos -735 a +95 del potenciador/promotor del gen temprano inmediato de CMV, ya que se ha demostrado que este promotor proporciona altos niveles de expresión en células que expresan E1A de un adenovirus (véase, por ejemplo, el documento WO 03/051927). El ácido nucleico de interés puede ser un ADN genómico, un ADNc, ADN sintético, una combinación de estos, etc.

Hay medios de cultivo disponibles a través de varios comercializadores, y a menudo se usan actualmente medios de cultivo sin suero para cultivo celular, debido a que están más definidos que los medios que contienen suero. Las células de la presente invención crecen bien en medio que contiene suero así como en medios sin suero. Las células de la invención crecen en general de manera adherente en medio que contiene suero, pero son muy eficaces para crecer en suspensión a altas densidades celulares (10×10^6 células/ml y mayores) en medio de cultivo sin suero, lo que significa que no necesitan una superficie a la que adherirse, pero siguen estando libres unos de otros y de las paredes del vaso de cultivo durante la mayoría del tiempo. Se han descrito procesos para cultivar las células de la

invención a altas densidades y/o para obtener rendimientos de producto muy altos a partir de estas células (documento WO 2004/099396).

El concepto de ingeniería genética para alterar la glucosilación de proteínas recombinantes producidas en una célula se ha establecido ampliamente, y se discute en detalle, por ejemplo, en el documento US 2005/0164386. Para este fin, el ácido nucleico que codifica la enzima de glucosilación deseada en formato expresable se introduce o se ha introducido en las células de acuerdo con la invención, y la enzima de glucosilación deseada se expresa durante el cultivo de las células de acuerdo con la invención cuando se expresa la proteína de interés. Esto da como resultado un patrón de glucosilación de la proteína de interés alterado en comparación con la situación cuando no se expresa enzima de glucosilación en las células. En la presente invención, la enzima de glucosilación es una sialiltransferasa, más preferentemente una alfa-2,3-sialiltransferasa. Preferentemente, la sialiltransferasa codificada es una sialiltransferasa de mamífero, más preferentemente una sialiltransferasa humana. El ácido nucleico que codifica la sialiltransferasa está preferentemente bajo el control de un promotor heterólogo, que debe ser activo o tener la posibilidad de regularse en las células de la invención. Preferentemente, el ácido nucleico que codifica la sialiltransferasa está integrado en el genoma de las células, para asegurar una herencia estable, y proporcionar la expresión estable de la sialiltransferasa en generaciones posteriores de las células.

La invención proporciona además AAT humano recombinante, obtenible mediante los métodos de acuerdo con la invención. De acuerdo con la invención, la AAT_{hr} tiene un patrón de glucosilación humano diferente al de la proteína homóloga humana natural aislada. La presente invención, en particular, proporciona una AAT_{hr} que comprende glucanos unidos en N, en la que al menos en 10% de dichos glucanos unidos en N son glucanos tetra-antenarios. Además, el AAT_{hr} obtenible de acuerdo con la presente invención tiene propiedades farmacocinéticas sorprendentes.

El AAT humano recombinante de acuerdo con la invención incluye AAT humana de longitud completa, pero también abarca fragmentos polipeptídicos biológicamente activos, tales como fragmentos de AAT humana con una o más eliminaciones de aminoácidos en, por ejemplo, el extremo N-terminal de la proteína, así como variantes biológicamente activas de AAT humana, tales como AAT con una o más sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservativas), una o más eliminaciones o adiciones de aminoácidos, que no cambian significativamente la actividad funcional de la proteína. En una realización, la AAT_{hr} de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada en el presente documento como SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, las secuencias de aminoácidos de variantes de AAT son al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% homólogas a la SEC ID N°: 1.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Generación de líneas celulares y productividades específicas

Se generaron setecientas líneas celulares de PER.C6 que expresaban AAT humano y que co-expresaban bien una α 2,6-sialiltransferasa (SIAT1; NM_003032) o una α 2,3-sialiltransferasa (SIAT4C; L23767) (PER.C6-AAT-ST3/PER.C6-AAT.ST6) en condiciones sin suero, tal como se describe en el documento WO 2006/070011. Se seleccionaron cuarenta y siete líneas celulares PER.C6 que producen AAT-ST3 (27 líneas celulares) o AAT-ST6 (20 líneas celulares) basándose en el rendimiento máximo determinado mediante ELISA (kit de ELISA de AAT, US Biologicals) a partir de programas de generación de líneas celulares independientes usando nucleofección como herramienta de transfección. El plásmido de expresión contenía la secuencia codificante para AAT humana (SEC ID N°: 2) y la secuencia codificante para ST3GallV, ambas dirigidas por un promotor de citomegalovirus que se ha modificado para lograr altos niveles de expresión génica en células PER.C6 (Yallop et al., 2005). Los mapas de plásmido de los vectores de expresión de AAT (pAATopt-ST3 y pAATopt-ST6 se muestran en la figura 9.

La productividad de las líneas celulares varió entre 8-22 picogramos por célula por día (pcd) (PER.C6-AAT-ST3) y 7-19 pcd (PER.C6-AAT-ST6) (véase la figura 1 y las tablas 1 y 2). Las líneas celulares se criopreservaron en medio Proper-1 (Lonza) (6 viales, $3\text{-}5 \times 10^6$ células/ml), cumpliendo un criterio de aceptación (viabilidad > 80%, buen crecimiento, dos pases después de la resucitación). Se generaron cultivos por lotes (en medio Proper-1), que se usaron para análisis bioquímico (véase el ejemplo 2).

Ejemplo 2

Análisis bioquímico
Integridad de PER.C6-AAT_r

Se analizaron los sobrenadantes de 47 cultivos por lotes en SDS-PAGE teñido con azul coloidal. Las cosechas de cultivo celular de las muestras de PER.C6-AAT_r (no purificadas) mostraron a AAT como la principal banda de

proteína en la SDS-PAGE. Además, los geles mostraron bandas de AAT intacto (mostradas en la figura 2) lo que indica la integridad del material.

Actividad de PER.C6-AATr

5 Inicialmente (en lugar de un ensayo de actividad cromogénico), se determinó una indicación respecto de la actividad analizando la formación de un complejo de PER.C6-AATr con elastasa de neutrófilos humana. Para este fin, las cosechas de cultivo de muestras de PER.C6-AATr se incubaron con 0, 0,1, 0,2 y 0,4 µg de elastasa durante 30 min a 37°C y posteriormente se aplicaron a un SDS-PAGE de BIS-Tris al 4-12 % y se tiñeron con azul coloidal). Todas las muestras de PER.C6-AATr ensayadas formaron un complejo con elastasa (datos no mostrados), lo que indica la actividad de las preparaciones. Se efectuó un análisis de la actividad adicional con un ensayo cromogénico basado en la inhibición de la elastasa de neutrófilos humana usando Prolastin® como referencia (adaptado a partir de Bruin et al., 2005)). Todas las muestras de PER.C6-AATr ensayadas, salvo una (PER.C6-AATr-ST3-234c), fueron al menos tan activas como Prolastin® (>90%) (tablas 1 y 2).

Análisis de glucanos de PER.C6-AATr

15 Para explorar respecto de muestras de PER.C6-AATr cuyos glucanos tuviesen un grado relativamente alto de protección con ácido siálico, necesario para un perfil PK óptimo, se aplicó un ensayo de lectina, usando lectina de *Erythrina cristagalli* (ECL) para la detección de las galactosas expuestas (véase la figura 3 para una visión esquemática del ensayo usado). De las 47 muestras ensayadas 15 mostraron una señal a DO405 con ECL > blanco + 0,2, lo que indica un grado relativamente alto de exposición de las galactosas terminales a los glucanos de estas muestras de AAT. Para unas pocas de estas muestras, el bajo grado de protección de los glucanos por medio de ácido siálico se confirmó mediante un análisis adicional de glucanos usando un método basado en HPLC (Hermentin et al., 1996; Gervais et al., 2003). Por lo tanto, las muestras de AATr con una señal de ECL a una DO405 > blanco + 0,2 no se sometieron adicionalmente a un análisis extensivo de glucanos y no se ensayaron en estudios PK.

25 El método de obtención de perfil de glucanos extendido se muestra esquemáticamente en la figura 3 e implica la liberación de los glucanos unidos en N de AAT con la enzima N-glucosidasa F (PNGasaF), y el marcaje de los glucanos con ácido 2-antranílico fluorescente (2-aa). Posteriormente, los glucanos se separan mediante cromatografía de intercambio aniónico (AEX) en grupos de acuerdo con su cara negativa, es decir, separación de los glucanos con diferentes números de ácido siálico. A partir de este perfil, se determina un número Z, que representa el grado de carga (es decir, sialilación) de los glucanos unidos en N.

La fórmula para Z:

35
$$Z = (A_{\text{Asialo}} \times 0) + (A_{\text{Monosialo}} \times 1) + (A_{\text{Disialo}} \times 3) + (A_{\text{Tetrasialo}} \times 4)$$
 (A = área, Hermentin et al., 1996).

Además, los glucanos desialilados se separan mediante cromatografía de fase normal (NP) en grupos según su tamaño, es decir, separación de los glucanos con diferente grado de ramificación (antenuaridad). A partir de este perfil, se determina un número A, que representa el grado de ramificación de los glucanos unidos en N.

40 La fórmula para A:

$$A = (A_{\text{Diantenario}} \times 2) + (A_{\text{Triantenario}} \times 3) + (A_{\text{Tetra-antenario}} \times 4).$$

45 Finalmente, al calcular la proporción Z/A, se obtiene el grado (porcentaje) de protección mediante ácido siálico de los glucanos unidos en N de una glicoproteína (Gervais et al., 2003).

50 Los perfiles de glucanos de PER.C6-AATr se muestran en las tablas 1 y 2. Los perfiles generales de muestras de PER.C6-AATr (tablas 1 y 2) muestran un 12-54 % de di-antena, un 13-39% de tri-antena y un 22-48% de tetra-antena y un 0-55% de di-sialo, 0-30% de trisialo, 0-29% de tetra-sialo. El grado de protección de los glucanos por ácido siálico de PER.C6-AATr varía del 0 al 92%, este grado de protección con ácido siálico no se correlaciona con las productividades específicas de las líneas celulares de PER.C6-AATr (r de Spearman = -0,024, p = 0,893) (tablas 1 y 2 y figura 4).

55 Tal como se esperaba, los glicanos con AATr positivo a ECL contienen un menor nivel de carga (sialilación) (intervalo de número Z: 0-124) frente a PER.C6-AATr negativo a ECL (intervalo de número Z: 151-253) (la diferencia es significativa, según se ensaya con la prueba de Mann-Whitney, p < 0,001) (véase la figura 5). Los glucanos de PER.C6-AATr positivo a ECL contienen un nivel mayor de antenuaridad (intervalo de número A: 299-322) frente a PER.C6-rAAT negativo a ECL (intervalo de número A: 266-307) (la diferencia es significativa, según se ensaya con la prueba de Mann-Whitney, p < 0,001) (véase la figura 5). Además, hay un menor grado de sialilación en los glucanos tetra-antenarios de PER.C6-AATr-ST6 (ECL negativo), que varían del 6 al 62% frente a PER.C6-AATr-ST3 (ECL negativo), que varía del 35 al 106% (la diferencia es significativa, según se ensaya con la prueba de Mann-Whitney, p < 0,001), mientras que este no es el caso para el grado general de sialilación (tablas 1 y 2, figura 6). La menor preferencia de ST6 por glucanos más ramificados (Joziasse et al., 1987) puede ser la causa del menor grado de sialilación en los glucanos tetra-antenarios de PER.C6-AATr-ST6 frente a PER.C6-AATr-ST3.

Los perfiles de glucano indican una tendencia para un mayor grado de ramificación en los glucanos de PER.C6-AATr en comparación con AAT procedente de plasma (Prolastin[®]), ya que el perfil para Prolastin[®] es: 80% de di-antena, 18% de tri-antena y 2% de tetra-antena (tablas 1 y 2). Este fenómeno también es evidente a partir de la comparación de los números A (figura 5 y tablas 1 y 2). El grado de protección de los glucanos mediante ácido siálico de Prolastin[®] es del 96% (tablas 1 y 2).

Ejemplo 3

Farmacocinética de PER.C6-AATr en un modelo de rata

Se estableció un modelo de rata para determinar la farmacocinética (PK) de PER.C6-AATr. El modelo debería ser capaz de detectar AAT presente en medio condicionado de PER.C6 no purificado (CM) a concentraciones de aproximadamente 40-100 µg/ml (a 2 ml/kg, dando como resultado dosis de aproximadamente 80-200 µg/kg).

Se efectuaron cuatro experimentos: los primeros dos para configurar el modelo y el segundo, tercero y cuarto experimento para seleccionar las líneas celulares de PER.C6-AATr que producen AATr con características PK óptimas. En estos estudios, se usó AATdp (Prolastin[®]) para establecer el modelo como referencia. El procedimiento experimental fue del siguiente modo: Se dosificó a ratas (Wistar macho, 8 semanas de edad) por vía i.v. en la vena caudal con las muestras de ensayo de AAT (volumen de la dosis 2 ml/kg, intervalo de dosis de 50-200 µg/kg, n = 3 ratas por grupo). Se extrajeron muestras de sangre a partir de la punta de la cola antes de la dosis y en varios instantes después de la administración de la dosis. Se recogió sangre en microcubetas de K₂EDTA y se preparó el plasma. Posteriormente se determinó la concentración de AAT residual en las muestras de plasma mediante ELISA (kit de ELISA de AAT, Affinity Biologicals). Los datos obtenidos se modelaron por rata con un modelo de 2 compartimentos y se determinaron posteriormente los parámetros PK.

Tal como se muestra por los datos del experimento 1 (véase la figura 7) se halló que el modelo es adecuado para determinar el perfil PK en muestras no purificadas porque las curvas de concentración en plasma frente al tiempo de Prolastin[®] añadido a PER.C6-CM y a control de tampón (PBS, 0,01% p/v, Tween-80 (PT) (dosis de 200 µg/kg) son similares. Se obtuvo un resultado similar con dosis de Prolastin[®] de 100 µg/kg (datos no mostrados). En la figura 7 se muestra también que se observa una respuesta aumentada con dosis de Prolastin[®] añadidas en CM de 50-200 µg/kg. A partir de los datos se calculó que Prolastin[®] tiene un tiempo medio de residencia (TMR) de 11-12 h. También se detectaron las muestras de PER.C6-AATr, mostrando PER.C6-AATr-ST3-202c una menor eliminación (TMR ~ 20,5 h) en comparación con Prolastin[®] y mostrando PER.C6-AATr-ST6-530 una eliminación más rápida (TMR ~ 3,6 h) en comparación con Prolastin[®] (Tabla 1 y 2). Basándose en estas observaciones, se llegó por lo tanto a la conclusión de que el modelo podría usarse para las muestras de PER.C6-AATr no purificadas, que se ensayaron en los experimentos 2-4 a un nivel de dosis de 100 µg/kg para todas las muestras. En la figura 8 se muestran perfiles PK representativos para PER.C6-AATr-ST3 y PER.C6-AATr-ST6 en comparación con Prolastin[®].

La última columna en las tablas 1 y 2 muestra los valores de TMR obtenidos en los experimentos PK. El ensayo estadístico en las diferencias entre muestras y grupos de muestras respecto al TMR se efectuó mediante ANOVA en valores logarítmicos transformados. Los TMR de las preparaciones tanto de PER.C6-AATr-ST3 y PER.C6-AATr-ST6 ensayadas fueron significativamente diferentes de las de Prolastin[®]. El TMR para 8 de 10 preparaciones de PER.C6-AATr-ST3 ensayadas fueron significativamente mayores que las de Prolastin[®] y variaron entre 18-23 h. Entre estas 8 preparaciones de PER.C6-AATr-ST3 las diferencias en los TMR no fueron significativas.

Los TMR de PER.C6-AATr-ST3-053b y -539 fueron significativamente menores que las de Prolastin[®]. Para PER.C6-AATr-ST3-0539 esto se debe al grado relativamente bajo de sialilación (49%) confirmado mediante el rescate del perfil PK de esta preparación en la primera hora durante el bloqueo del receptor de asialoglucoproteína mediante inyección conjunta con asialofetina (datos no mostrados). El perfil de glucanos para PER.C6-AATr-ST3-053b no fue concluyente (sin asignación clara de picos posible), sin embargo, también en este caso el defecto en la sialilación es lo más probablemente la causa del bajo TMR.

Para todas las preparaciones de PER.C6-AATr-ST6 ensayadas el TMR fue significativamente menor que el de Prolastin[®] variando entre 3,4-3,9 h. Esto puede explicarse por el grado relativamente bajo de sialilación de los glucanos tetra-antenarios en PER.C6-AATr-ST6 (variando del 6 al 62%) y/o mediante un mecanismo potencial diferente de eliminación de AAT sialilado en α 2,3 frente a AAT sialilado en α 2,6.

Conclusiones

De acuerdo con la presente invención, se han generado líneas celulares de PER.C6 que producen AAT humana con un alto rendimiento (de hasta 22 pcd) y con una cantidad aceptable, es decir, las preparaciones fueron activas en un ensayo *in vitro*. De manera sorprendente e interesante, se demostraron perfiles PK prometedores en un modelo de rata. Las células PER.C6 forman, por lo tanto, una plataforma adecuada para la producción de AAT humano recombinante para su uso en, entre otras cosas, el enfisema relacionado con la deficiencia de AAT o para su uso en otras enfermedades inflamatorias con daño tisular mediado por neutrófilos. La AAThr de la presente invención

puede, sin embargo, producirse de manera adecuada en otros tipos celulares de mamífero que coexpresan una 2,3- o 2,6-sialiltransferasa.

Tabla 1. Productividades específicas, actividad y perfiles de glucanos de PER.C6®-AATr-ST3

Línea celular de PER.C6®-AATr-ST3	Qp (pcd, n=1 o *n=2)	Proporción de actividad Cr/Ag (n=3)	Di-antenario (%)	Tri-antenario (%)	Tetra-antenario (%)	Número A	Asialo (%)	Mono-sialo (%)	Di-sialo (%)	Tri-sialo (%)	Tetra-sialo (%)	Número Z	Grado de Sialo en tetra (%)	Grado Z/A (%)	TMR (h)
Líneas celulares negativas a ECL															
098a	22*	1,12	50,52	22,92	26,53	276	13,62	11,02	42,23	14,67	18,46	213	69,6	77,2	18,3
246c	20*	1,17	49,52	21,22	27,39	272	9,81	10,93	39,57	19,82	19,88	229	72,6	84,2	23,2
221c	19	1,03	52,24	24,46	21,97	266	7,98	12,94	39,4	22,08	17,6	228	80,1	85,7	18,3
202c	17*	1,06	48,89	23,31	26,23	272	5,64	9,8	40,41	19,43	24,71	248	94,2	91,2	20,5
019c	16	0,98	49,95	24,36	24,03	269	18,4	14,48	34,36	17,85	14,9	196	62,0	72,9	21,1
607	15	1,3	51,82	21,09	27,08	275	5,17	16,04	28,77	21,39	28,63	252	105,7	91,6	20,2
028c	15	1,03	42,17	27,83	29,44	286	20,71	11,52	33,3	19,35	15,11	197	51,3	68,9	21,7
539	14	1,17	23,71	39,18	35,53	307	31,52	25,63	15,21	15,23	12,41	151	34,9	49,2	5,1
013b	14*	1	50,97	23,24	23,93	267	7,85	14,04	37,47	22,04	18,59	229	77,7	85,8	
234c	11	0,68	39,98	26,62	33,42	294	18,23	20,58	23,72	16,59	20,89	201	62,5	68,4	
293c	10*	1,17	52,19	19,78	28,02	276	1,94	19,9	31,87	19,54	26,75	249	95,5	90,2	22,5
604	10	1,16	52,19	21,87	25,93	274	4,86	45,01	23,21	14,25	12,63	185	48,7	67,5	
602	10	1,1	47,23	20	31,85	282	2,48	7,93	47,01	19,33	23,25	253	73,0	89,7	
529	9*	1,2	51,25	22,72	24,88	270	6,41	14,42	38,21	20,39	20,57	234	82,7	86,7	
223c	9	1,03	47,34	25,45	25,92	275	10,05	13,38	35,6	21,83	19,13	227	73,8	82,5	
053b	9	0,94	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	5,7
Líneas celulares positivas a ECL															
031c	21	0,99													
580	19*	1,04													
612	18*	1,05	28,85	37,51	33,63	305	84,01	10,19	4,25	1,15	0,41	24	1,2	7,9	
608	17*	1,15	30,29	37,37	31,47	299	>95					0	0,0	0,0	
045c	14*	1,14													
032c	14	1,08													
534	11	0,99	11,66	35,84	47,7	322	>95					0	0,0	0,0	
236c	10	0,98													
610	9	1,09													
354b	8	0,96	29,38	30,45	39,57	308	50,01	12,42	14,02	10,63	12,92	124	32,7	40,3	
040c	8	0,98	23,9	37,18	36,8	307	>95					0	0,0	0,0	
AAT procedente de plasma (n = 2 para perfiles de glucano, n = 4 para PK)															
Prolastin®	na	1	80,27	17,92	1,85	222	0,05	8,06	71,3	19,23	1,37	214	74,3	96,2	11,2
† perfil de glucanos no concluyente															

AAT: α1-antitripsina, Qp: productividad específica, pcd: picograma por célula por día, Cr: ensayo cromogénico, Ag: antígeno de ELISA, Sia: ácido siálico, TMR: tiempo medio de residencia, h: horas, ECL: lectina de *Erythrina cristagalli*, PK: farmacocinética

Tabla 2. Productividades específicas, actividad y perfiles de glucanos de PER.C6 [®] -AATr-ST6															
Línea celular de PER.C6 [®] -AATr-ST6	Qp (pcd, n=1 o *n=2)	Proporción de actividad Cr/Ag (n=3)	Di-antenario (%)	Tri-antenario (%)	Tetra-antenario (%)	Número A	Asialo (%)	Mono-sialo (%)	Di-sialo (%)	Tri-sialo (%)	Tetra-sialo (%)	Número Z	Grado de Sia en tetra (%)	Grado de Sia Z/A (%)	TMR (h)
Líneas celulares negativas a ECL															
297	19*	1,19	53,24	19,6	27,16	274	6,79	14,73	52,85	17,41	8,22	206	30,3	75,2	
621	19	1,08	50,77	12,7	36,52	286	3,22	14,41	40,6	23,5	18,27	239	50,0	83,6	3,4
565	15*	1,02	46,41	24,72	28,22	280	23,43	15,85	39,59	13,6	7,53	166	26,7	59,3	
618	14	1,19	48,09	15,89	32,63	274	391	20,14	39,45	20,69	15,81	224	48,5	81,8	38
505	13	1,17	51,27	19,21	28,14	273	5,56	14,08	47,77	20,76	11,72	219	41,6	80,2	
530	13*	0,99													3,6
517	12	1,12	54,26	18,44	27,3	273	4,38	11,35	49,29	19,93	15,07	230	55,2	84,2	
506	12	1,06	48,37	17,77	33,11	282	3,58	12,71	51,53	30,32	1,86	214	5,6	75,9	
560	12*	0,94	47,2	23,6	28,04	277	72	13,32	55,33	15,24	8,92	205	31,8	74,0	
607	11	0,95	46,24	20,78	32,98	287	15,61	38,38	21,7	11,64	12,66	167	38,4	58,2	
035c	11	1,11	49,29	16,72	33,19	282	2,05	9,75	52,61	19,46	16,13	238	48,6	84,4	
514	10	0,99	52,74	18,66	28,6	276	3,85	16,86	38,6	22,87	17,81	234	62,3	84,8	3,9
537	10	0,93	48,23	20,07	30,22	278	8,35	16,34	45,96	18,39	10,95	207	36,2	74,5	
084c	9	1,05	49,45	17,59	32,47	283	1,79	10,21	51,4	21,37	15,23	238	46,9	84,1	
613	8	1,13	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	
617	7	0,98	52,52	19,79	27,68	275	5,55	22,6	41,75	18,06	12,03	208	43,5	75,6	
Líneas celulares positivas a ECL															
529	13	1,09	24,91	37,46	37,59	313	83,59	11,62	3,64	0,68	0,46	23	1,2	7,3	
548	11*	1,01													
66	11	0,96	23,23	33,13	43,64	320	5501	23,54	1309	4,87	3,49	78	8,0	24,4	
528	10	0,98													
AAT procedente de plasma (n = 2 para perfiles de glucano, n = 4 para PK)															
Prolastin [®]	a	1	80,27	17,92	1,85	222	0,05	8,06	71,3	19,23	1,37	214	74,3	96,2	11,2
† perfil de glucanos no concluyente															

AAT: α1-antitripsina; Qp: productividad específica, pcd: picograma por célula por día; Cr: ensayo cromogénico, Ag: antígeno de ELISA; Sia: ácido siálico; TMR: tiempo medio de residencia; h: hora; ECL: lectina de *Erythrina cristagalli*; PK: farmacocinética

SEC ID Nº: 1

Secuencia de aminoácidos de AAT

Mpssvswgillllaglcclvpvslaedpqqdaaqktdtshhdqdhptfnkitpnlaefafs
 lyrqlahqsnstniffspvsiatafamlslgtkadthdeileglfnfnlteipeaqihegf
 qellrtlnqpdsqlqlttgnglflseglklvdkfledvkklyhseaftvnfgdteeakkq
 indyvekgtgqkivdlvkeldrdtvfalvnyiffkkgkwerpfevkdteeedfhvdqvttv
 kvpmmkrlgmfnihqckklsswvllmkylgnataiffpdegklqhlenelthdiitkfl
 enedrrsaslhlpklisitgtydlksvlgqlgitkvfsngadlsgvteeaplklskavhka
 vltidekgteaagamfleaipmsippevkfnkpfvflmieqntksplfmgkvvnptqk*

5

SEC ID Nº: 2

CDS optimizado de AAT (basado en NM_000295)

atgccagcagcgtgagctggggcatcctgctgctggccggcctgtgctgcctggtgcc
 gtgagcctggccgaggacccccagggcgacgccgccagaaaaccgacaccagccaccac
 gaccaggaccaccccaccttcaacaagatcacccccaacctggccgagttcgcttcagc
 ctgtaccggcagctggcccaccagagcaacagcaccaacatctttttcagccccgtgagc
 atcgccaccgcttcgccatgctgtccctgggcaccaaggccgacacccacgacgagatc
 ctggaaggcctgaacttcaacctgaccgagatccccgaggcccagatccacgagggttc
 caggaactgctgcgaccctgaaccagcccagcagccagctccagctcaccaccggcaac
 ggctgtttctgagcgagggcctgaaactggtggacaagtctctcgaagatgtgaagaag
 ctgtaccacagcagggccttcaccgtgaacttcggcgacaccgaggaagccaagaagcag
 atcaacgactcgtggagaagggcaccagggcaagatcgtggacctggtgaaagagctg
 gaccgggacaccgtgttcgcccctgggtgaactacatcttctcaagggcaagtggagcgg
 cctttcgaggtgaagataccgaggaagagacttccacgtggaccaggtgaccaccgtg
 aaggtgcccattgatgaagcggctgggcatgttcaacatccagcactgcaagaagctgtcc
 agctgggtcctgctgatgaagtacctgggcaacgccaccgccatctttttctgcccagc
 gagggcaagctgcagcacctggaaaacgagctgaccacgacatcatcaccaagtttctg
 gaaaatgaggaccggcgagcgccagcctgcacctgcccaagctgtccatcaccggcacc
 tacgacctgaagagcgtgctgggcccagctgggcatcaccaaggtgttcagcaacggcgcc
 gacctgagcggcgtgaccgaagaggccccctgaagctgtcctaaggcctgcacaaggcc
 gtgctgaccatcgacgagaaggggaccgaagccgcccggagccatgtttctggaagccatc
 cccatgagcatccccccgaggtgaagttcaacaagccttcgtgttccctgatgatcgag
 cagaacaccaagagccccctgttcatgggcaaggtggtgaacccccacccaaaagtga

10

Referencias

15 A Gervais, YA Hammel, S Pelloux, P Lepage, G Baer, N Carte, O Sorokine, JM Strub, R Koerner, E Leize y A Van Dorsselaer. 2003. Glycosylation of human recombinant gonadotrophins: characterization and batch-to-batch consistency. *Glycobiology*, 13: 179-189.

20 P Hermentin, R Witzel, EJ Kanzy, G Diderich, D Hoffmann, H Metzner, J Vorlop y H Haupt. 1996. The hypothetical N-glycan charge: a number that characterizes protein glycosylation. *Glycobiology*, 6: 217-230.

DH Joziase, WE Schiphorst, DH Van den Eijnden, JA Van Kuik, H Van Halbeek y JF Vliegenthart. 1987. Branch specificity of bovine colostrum CMP-sialic acid: Gal beta 1-4GlcNAc-R alpha 2-6-sialyltransferase. Sialylation of bi-, tri-, and tetraantennary oligosaccharides and glycopeptides of the N- acetyllactosamine type. *J. Biol. Chem.* 262: 2025-2033.

25 E Karnaukhova, Y. Ophir y B. Golding. 2006. Recombinant human alpha-1 proteinase inhibitor: towards therapeutic use. *Amino Acids* 30: 317-332.

30 AT Mulgrew, CC Taggart y NG McElvaney. 2007. Alpha-1-Antitrypsin Deficiency-Current Concepts. *Lung* 185: 191-201.

- TL Spencer, JE Humphries y ML Brantly. 2005. Antibody Response to Aerosolized Transgenic Human Alpha1 Antitrypsin NEJM 352: 30-31.
- 5 CA Yallop, J Crowley, J Cote, K Hegmans-Brouwer, F Lagerwerf, R Gagne, JC Martin, N Oosterhuis, DJ Opstelten y A Bout. 2005a. PER.C6 cells for the manufacture of biopharmaceutical proteins. En "Modern Biopharmaceuticals. Volumen 3. Design, Development and Optimization", págs. 779-807. Wiley-VCH, Alemania.
- 10 C. Yallop, M. Raadsman, M. Zuiderwijk, Y. Van Noordenburg, A. Vooys, R. Keehnen, B. Van Montfort, M. Jansen, F. Lagerwerf, R. Dijkstra y otros. 2005b. High level production of recombinant IgG in the human cell line PER.C6. En: Godia F. Fussenegger M., Editores. Animal cell technology meets genomics: Springer. P. 533-536.
- 15 E.C. Bruin, D. Roem, I. Bulder, M. Dieker, G. Voerman, C.E. Hack. 2005. Production, purification and characterisation of recombinant Fabsin, a novel antistatin-type proteinase inhibitor. FEMS Yeast Res. 5(11): 1069-1077.
- A. Varki, R Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart, J. Marth. 1999. Essentials of glycobiology. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., EE.UU.
- 20 A. Harduin-Lepers, V. Vallejo-Ruiz, Krzewinsky-Recchi Mass., B. Samyn-Petit, S. Julien, P. Delannoy. 2001. The human sialyltransferase family. Biochimie 83: 727-737.
- E.C. Lewis, M. Mizrahi, M. Toledano, N. DeFelice, J.L. Wright, A. Churg, L. Shapiro, C.A. Dinarello. 2008. α 1-Antitrypsin monotherapy induces immune tolerance during islet allograft transplantation in mice. PNAS 105: 16236-16241.
- 25 M. Koulmanda, M. Bhasin, L. Hoffman, Z. Fan, A. Qipo, H. Shi, S. Bonner-Weir, P. Putheti, N. Degauque, T.A. Libermann, H. Auchincloss, Jr., J.S. Flier, T.B. Strom. 2008. Curative and β cell regenerative effects of α 1-antitrypsin treatment in autoimmune diabetic NOD mice. PNAS 105: 16242-16247.
- 30 W.W. Nichols, R. Lardenoie, B.J. Ledwith, K. Brouwer, S. Manam, R. Vogels, D. Kaslow, D. Zuidgeest, A.J. Bett, J. Chen y otros. 2002. Propagation of adenoviral vectors: use of PER.C6 cells. En: Curiel D. Douglas J.T. editors. Adenoviral vectors for gene therapy. San Diego: Elsevier. P. 129-167.
- 35 D.M. Olive, W. Al-Mulla, M. Simsek, S. Zarban, W. al-Nakib. 1990. The human cytomegalovirus immediate early enhancer-promotor is responsive to activation by the adenovirus-5 13S E1A gene. Arch. Virol. 112: 67-80.
- C.M. Gorman, D. Gies, G. McGray, M. Huang. 1989. The human cytomegalovirus major immediate early promoter can be transactivated by adenovirus early proteins. Virology 171: 377-385.

REIVINDICACIONES

1. α 1-antitripsina humana recombinante (AAThr) que comprende glucanos unidos en N, caracterizado por que:
 - 5 (a) al menos el 10% de dichos glucanos unidos en N son glucanos tetra-antenarios; y
 - (b) el grado de protección con ácido siálico en dichos glucanos unidos en N (Z/A) es de al menos el 50%, en la que al menos el 50% de la sialilación en dichos glucanos unidos en N es α -2,3-sialilación.
- 10 2. AAThr de acuerdo con la reivindicación 1, en la que al menos en 20% de dichos glucanos unidos en N son glucanos tetra-antenarios.
3. AAThr de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que de aproximadamente un 10% a un 50% de dichos glucanos unidos en N son glucanos tetra-antenarios.
- 15 4. AAThr de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que de aproximadamente un 20% a un 40% de dichos glucanos unidos en N son glucanos tetra-antenarios.
- 20 5. AAThr de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que al menos un 90% de la sialilación total de dichos glucanos unidos en N es α -2,3-sialilación.
6. AAThr de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el grado de protección con ácido siálico en dichos glucanos unidos en N (según se calcula por la relación Z/A) es de al menos el 70%, preferentemente al menos un 80%, más preferentemente al menos el 90%.
- 25 7. AAThr de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el grado de protección con ácido siálico en dichos glucanos unidos en N que son tetra-antenarios es de al menos el 20%.
8. AAThr de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el grado de protección con ácido siálico en dichos glucanos unidos en N que son tetra-antenarios es de al menos el 50%.
- 30 9. AAThr de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el grado de protección con ácido siálico en dichos glucanos unidos en N que son tetra-antenarios es de aproximadamente el 50% a aproximadamente el 97%.
- 35 10. AAThr de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el grado de protección con ácido siálico en dichos glucanos unidos en N que son tetra-antenarios es de aproximadamente el 70% a aproximadamente el 95%.
11. AAThr de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso como medicamento.
- 40 12. AAThr de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad asociada con deficiencia en AAT, y/o una enfermedad que implica daño tisular mediado por neutrófilos.
- 45 13. Método para producir α 1-antitripsina humana recombinante (AAThr) de la reivindicación 1, que comprende las etapas de proporcionar una célula PER.C6 con un ácido nucleico que codifica α 1-antitripsina humana de tal forma que dicha célula PER.C6 porta dicho ácido nucleico de una manera expresable; y cultivar dicha célula PER.C6 en condiciones que conducen a la producción de dicha α 1-antitripsina humana recombinante, en el que dicha célula PER.C6 se modifica para expresar conjuntamente una α 2,3 sialiltransferasa.
- 50 14. AAThr de acuerdo con la reivindicación 1, que puede obtenerse mediante un método de acuerdo con la reivindicación 13.

FIG. 1

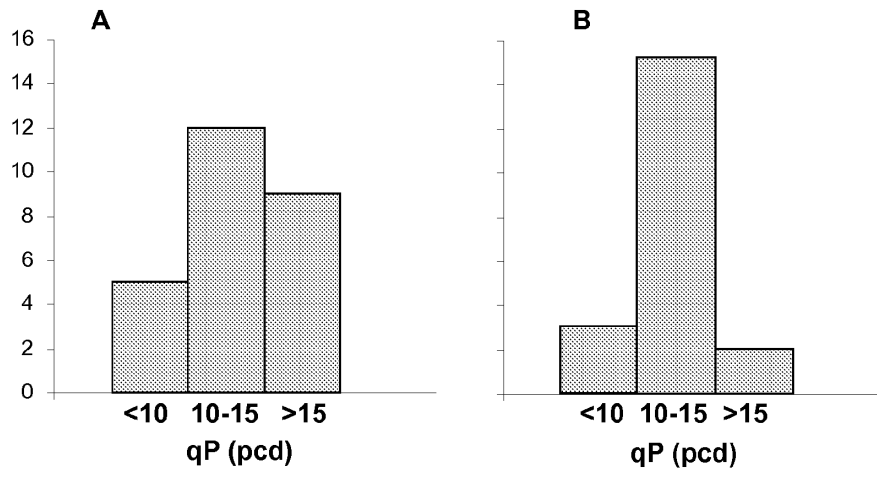


FIG. 2

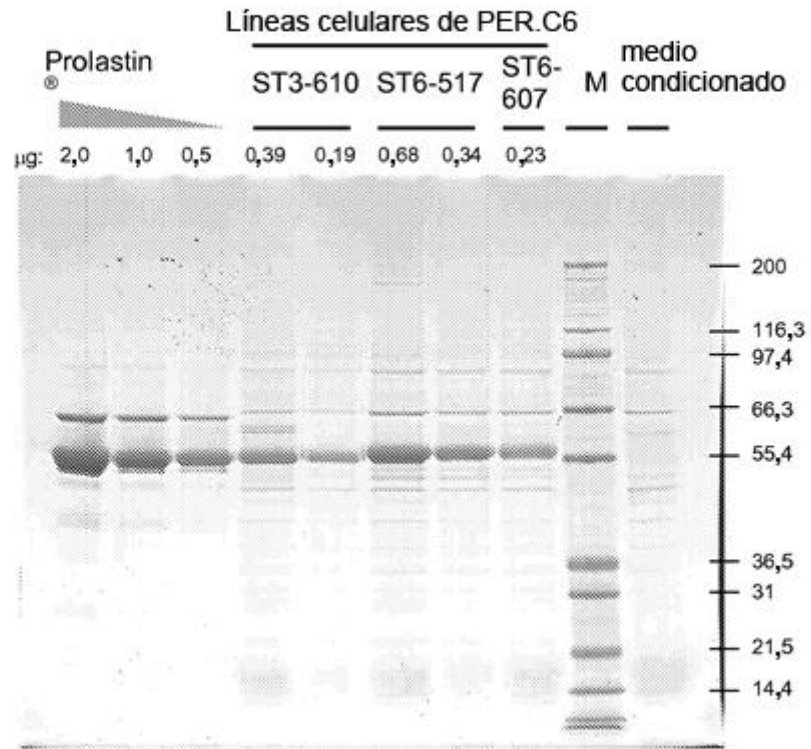


FIG. 3

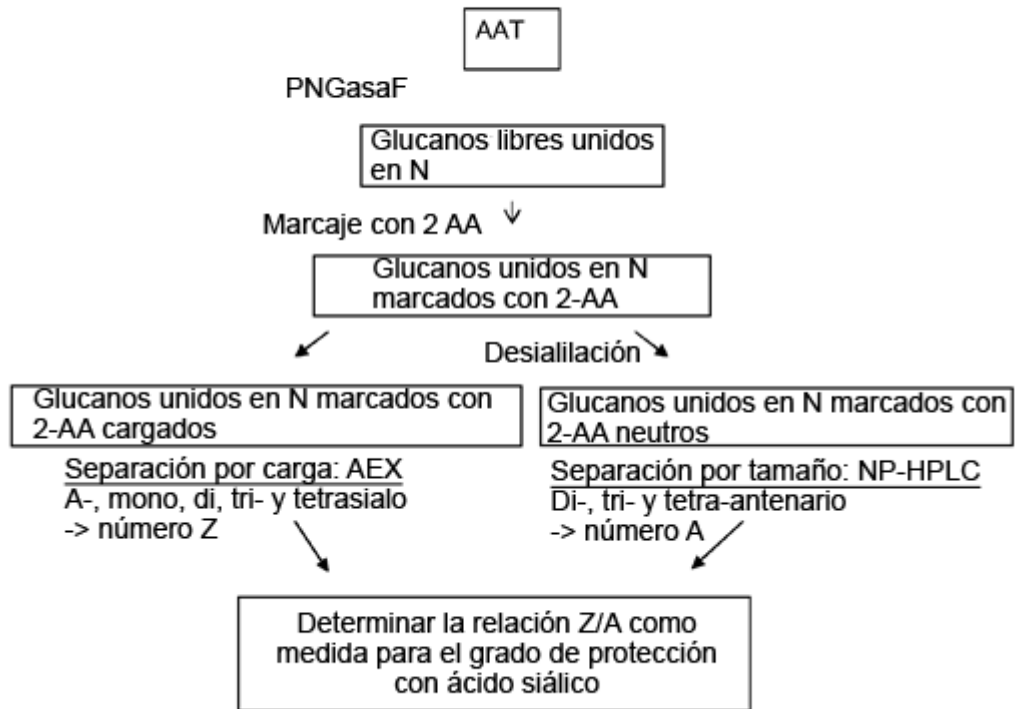


FIG. 4

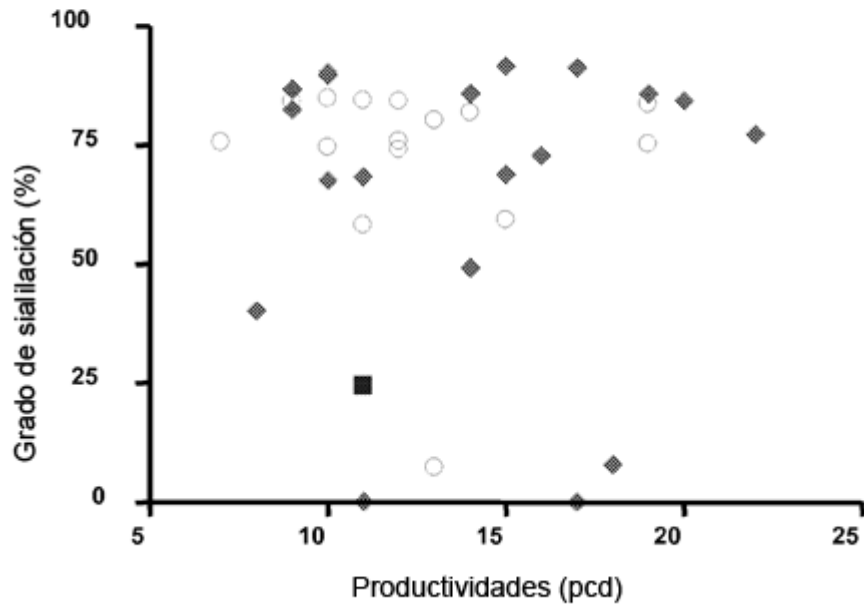


FIG. 5

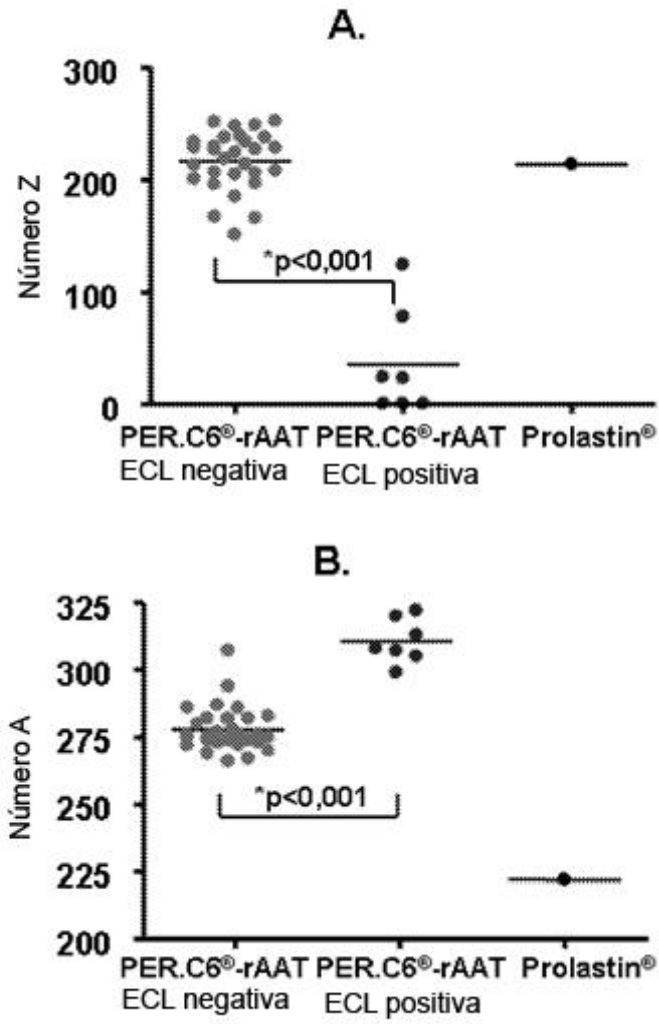


FIG. 6

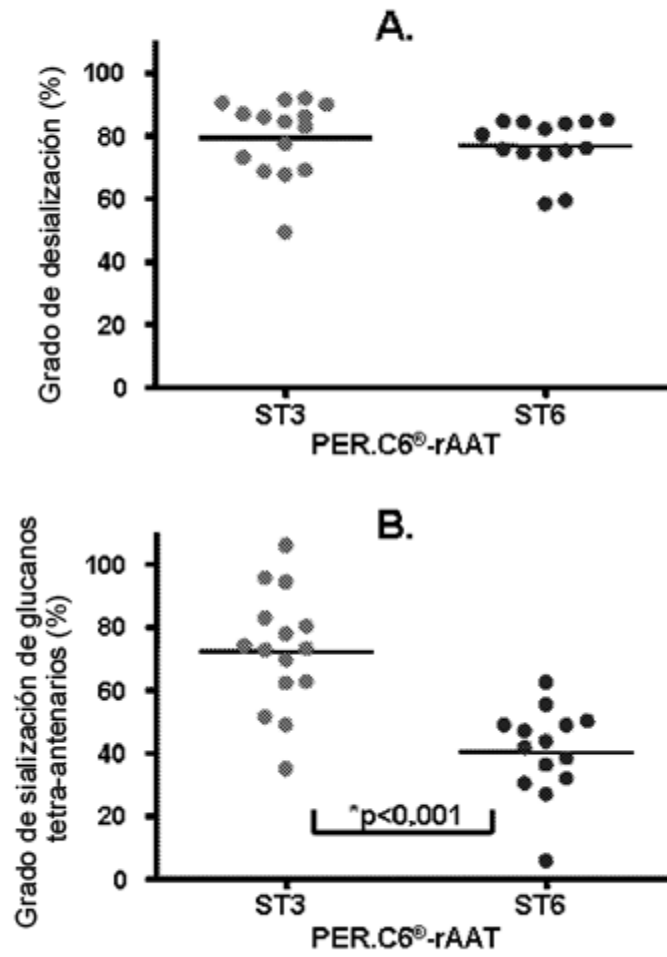


FIG. 7

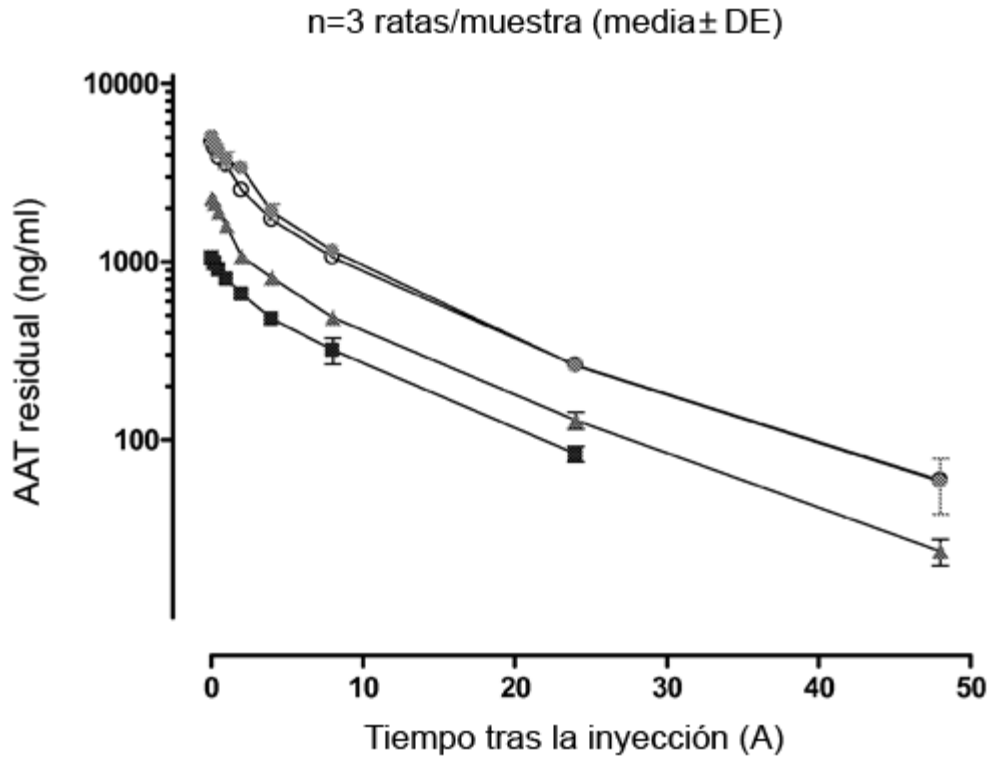


FIG. 8

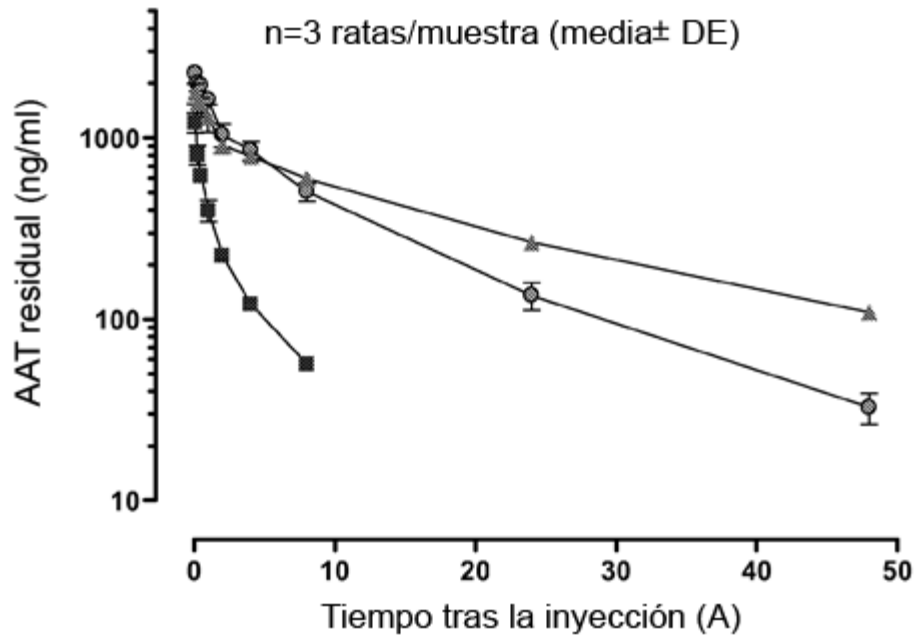
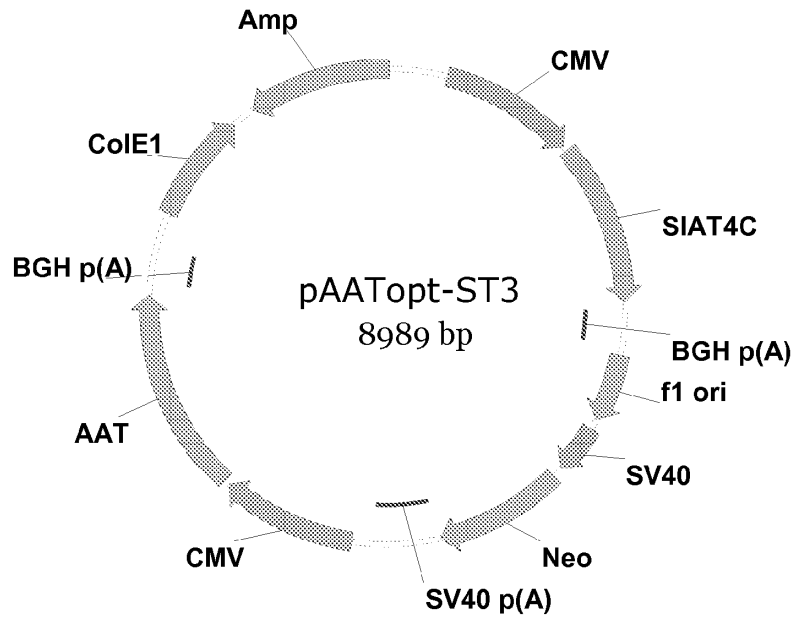


FIG. 9

A.



B.

