

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **035066**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2020.04.23**

(21) Номер заявки  
**201390080**

(22) Дата подачи заявки  
**2011.07.08**

(51) Int. Cl. **C07K 14/755** (2006.01)  
**C12N 5/00** (2006.01)  
**A61K 38/36** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)

---

---

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ КЛЕТОК  
МЛЕКОПИТАЮЩЕГО, СОДЕРЖАЩЕЙ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЙ  
РЕКОМБИНАНТНЫЙ ФАКТОР ФОН ВИЛЛЕБРАНДА (rVWF)**

---

(31) **61/362,635**

(32) **2010.07.08**

(33) **US**

(43) **2013.06.28**

(86) **PCT/US2011/043455**

(87) **WO 2012/006591 2012.01.12**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**БАКСАЛТА ИНКОРПОРЕЙТИД  
(US); БАКСАЛТА ГМБХ (CH)**

(72) Изобретатель:  
**Грилльбергер Леопольд, Райтер  
Манфред, Мундт Вольфганг (AT)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(56) **WO-A2-2009086309  
WO-A1-2008109410  
EP-A2-1096017  
US-A-4767704**

(57) Изобретение относится к способу получения культуральной жидкости клеток млекопитающего, содержащей высокомолекулярный рекомбинантный фактор фон Виллебранда (rVWF), в присутствии 2,4-20 мкг/л соли меди, 4 мМ аммония,  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл. Также изобретение относится к полученной заявленным способом культуральной жидкости клеток млекопитающего, обладающей удельной ристоцетин-кофакторной активностью rVWF, составляющей по меньшей мере 30 мЕ/мкг rVWF.

**B1****035066****035066****B1**

### Перекрестные ссылки на заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 61/362635, поданной 8 июля 2010 г., описание которой включено в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте для любых целей.

### Область техники

Рекомбинантная экспрессия терапевтических белков в культуре клеток (в частности, крупномасштабных культурах клеток), включая культуры эукариотических клеток, и, конкретнее, культуры клеток млекопитающих, требует применения специальных культуральных сред, обеспечивающих питательные вещества для эффективного роста клеток. В составы сред для клеточных культур часто входят различные добавки, включая эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС), животные белки и/или гидролизаты белков крупного рогатого скота, а также белковые гидролизаты, полученные из растений или дрожжей. Одна из проблем, связанных с такими культурами, состоит в том, что количество получаемого белка, а также общая и удельная активность указанного белка часто варьируют в разных культурах клеток, даже в случае, когда состав среды для культуры клеток неизменен. Эта вариабельность особенно очевидна в случае крупномасштабных производственных процессов с применением объемов клеточных культур от 10 л до более чем 20000 л. Вариабельность для разных культур клеток особенно часто наблюдают для сред для клеточных культур, содержащих гидролизаты, что приводит к уменьшению продукции общего продуцируемого количества белка, а также уменьшению общей и удельной активности.

Одной из возможных причин вариабельности, наблюдаемой в разных культурах клеток, является то, что загрязняющие примеси в добавках, таких как гидролизаты, варьируют от партии к партии. Как правило, сыворотка или полученные из сыворотки вещества, такие как, например, альбумин, трансферрин или инсулин, могут содержать нежелательные агенты, которые могут загрязнять культуры клеток и получаемые из них биологические продукты. Кроме того, получаемые из сыворотки крови человека добавки должны быть проверены на все известные вирусы, включая вирусы гепатита и ВИЧ, которые могут передаваться через сыворотку крови. Более того, бычья сыворотка и получаемые из нее продукты несут риск заражения КГЭ. Помимо этого, все полученные из сыворотки продукты могут быть загрязнены неизвестными веществами. При применении для культуры клеток сыворотки или белковых добавок, полученных от человека или животных, возникают многочисленные проблемы (например, варьирующие качество и свойства составов из разных партий и риск загрязнения микоплазмой, вирусами или КГЭ), в частности, если указанные клетки применяют для производства лекарственных средств или вакцин для введения человеку. Поэтому было предпринято множество попыток получения эффективной системы хозяина и условий культивирования, для которых не требуется сыворотка или другие белковые вещества животного происхождения.

Такие бессывороточные среды разрабатывались на основе белковых экстрактов, получаемых из растений или дрожжей. Например, известно, что гидролизаты сои подходят для процессов ферментации и могут усиливать рост многих микроорганизмов со сложными питательными потребностями, дрожжей и грибов. В WO 96/26266 указано, что папайновые гидролизаты соевой муки являются источником углеводов и азота, и многие ее компоненты могут применяться для тканевых культур. Franek et al. (Biotechnology Progress (2000) 16, 688-692) описывают эффекты стимуляции роста и продуктивности определенных пептидных фракций гидролизатов сои и пшеницы.

В WO 96/15231 описана бессывороточная среда, состоящая из синтетической минимальной питательной среды и дрожжевого экстракта, для размножения клеток позвоночных животных и процесса воспроизводства вирусов. Состав среды, состоящей из основной среды для культур клеток, содержащей пептид риса, экстракт дрожжей и их ферментативный гидролизат, и/или растительные липиды для роста животных клеток, описан в WO 98/15614. Содержащая очищенный соевый гидролизат среда для культивирования рекомбинантных клеток описана в WO 01/23527. В WO 00/03000 описана среда, которая содержит соевый гидролизат и дрожжевой экстракт, но также требует и присутствия рекомбинантных форм животных белков, таких как факторы роста.

В EP-A-0481791 описана культуральная среда с заданным биохимическим составом для культивирования сконструированных клеток CHO, не содержащая белков, липидов и углеводов, выделенных из животных источников, содержащая также рекомбинантный инсулин или аналог инсулина, 1% к 0,025% (мас./об.) пептона расщепленной папайном сои, и путресцин. В WO 98/08934 описана бессывороточная культура эукариотических клеток, содержащая гидролизованые соевые пептиды (1-1000 мг/л), от 0,01 до 1 мг/л путресцина и разнообразные компоненты животного происхождения, включая альбумин, фетuin, различные гормоны и другие белки. В этом контексте следует отметить, что, как известно, путресцин входит также в стандартные среды, например в среду DMEM/Хэма F12 в концентрации 0,08 мг/л.

Растительные и/или дрожжевые гидролизаты, однако, представляют собой неопределенные смеси олигопептидов и других неизвестных компонентов и загрязнителей. При этом свойства коммерчески доступных партий гидролизатов существенно варьируют. В результате выход рекомбинантных белков или вирусных продуктов значительно различается (разница составляет до трехкратной) в зависимости от партии используемого гидролизата ("разброс от партии к партии"). Этот недостаток влияет на пролиферацию клеток, а также экспрессию белков в каждой клетке. В US 2007/0212770 описаны различные не

содержащие животных белков и олигопептидов, культуральные среды с заданным химическим составом, подходящие для крупномасштабного производства рекомбинантных белковых биофармацевтических средств.

Гемостаз включает взаимодействие различных путей гемостатических реакций, в итоге приводящих к образованию тромба. Тромбы представляют собой отложения компонентов крови на поверхности стенок сосудов, состоящие в основном из агрегированных тромбоцитов крови и нерастворимого перекрестно-сшитого фибрина.

Образование фибрина происходит в результате сдерживания протеолиза фибриногена под действием тромбина, фермента свертывания. Тромбин представляет собой конечный продукт каскада свертывания, последовательной активации зимогена на поверхности активированных тромбоцитов и лейкоцитов, и различных клеток сосудов (для ознакомления см. K.G. Mann et al., Blood, 1990, Vol. 76, pp. 1-16).

Важной функцией каскада свертывания является активация фактора X комплексом активированного фактора IX (фактора IXa) и активированного фактора VIII (фактора VIIIa). Дефицит или дисфункция компонентов этого комплекса связаны с заболеванием крови, известным как гемофилия (J.E. Sadler & E.W. Davie: Hemophilia A, Hemophilia B, and von Willebrand's Disease ("Гемофилия А, гемофилия В и болезнь Виллебранда"), в G. Stamatoyannopoulos et al. (Eds.): The molecular basis of blood diseases ("Молекулярные основы заболеваний крови"). W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1987, pp. 576-602). Гемофилия А связана с дефицитом активности фактора VIII, в то время как гемофилия В связана с дефицитом фактора IX. Современное лечение представляет собой заместительную терапию с применением фармацевтических препаратов, содержащих нормальный фактор свертывания. Из указанных тромбопатий гемофилия А встречается чаще, поражая примерно одного человека из 10000. Заместительная терапия у пациентов с гемофилией А включает повторяющееся введение препаратов, содержащих нормальный фактор VIII, путем внутривенной инфузии. Интервал между инфузиями представляет собой функцию от снижения активности фактора VIII в кровотоке. Полупериод активности фактора VIII после инфузии различен у разных индивидуумов, варьируя от 10 до 30 ч. Таким образом, профилактическая терапия требует инфузии каждые 2-3 дня. Это является тяжелым бременем для пациентов с гемофилией, в частности в случаях, когда венозный доступ затруднен в результате местной карбонизации после частых проколов иглой для внутривенных инфузий.

Снижение частоты инфузии за счет применения фактора VIII с продленным периодом полужизни было бы очень благоприятно. В данной области техники хорошо известно, что время полураспада неактивированного гетеродимера фактора VIII сильно зависит от присутствия фактора фон Виллебранда, проявляющего высокое сродство к фактору VIII (но не к фактору VIIIa) и служащего белком-переносчиком (J.E. Sadler and E.W. Davie: Hemophilia A, Hemophilia B and von Willebrand's disease, в G. Stamatoyannopoulos et al. (Eds.): The molecular basis of blood diseases. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1987, pp. 576-602). Известно, что пациенты, страдающие от болезни Виллебранда типа 3, не имеющие детектируемого уровня фактора фон Виллебранда в кровотоке, страдают также от вторичного дефицита фактора VIII. Кроме того, период полураспада введенного внутривенно фактора VIII у таких пациентов составляет от 2 до 4 ч, что заметно меньше 10-30 ч, наблюдаемых у пациентов с гемофилией А. Из полученных результатов следует, что фактору VIII свойственна тенденция к быстрому выведению из кровотока и что этот процесс до некоторой степени подавляется комплексообразованием с его естественным переносчиком - фактором фон Виллебранда.

Фактор фон Виллебранда (vWF) представляет собой гликопротеин, циркулирующий в плазме в виде ряда мультимеров, размер которых варьирует, как правило, от приблизительно 500 до 20 000 кДа (или 2-40 димеров vWF). Димерные и мультимерные формы vWF составлены 250 кДа полипептидными субъединицами, связанными друг с другом дисульфидными связями. vWF опосредует первичную адгезию тромбоцитов к субэндотелию поврежденной стенки сосуда; только мультимеры большего размера проявляют также гемостатическую активность. Мультимеризованный vWF связывается с поверхностным гликопротеином тромбоцитов Gp1ba посредством взаимодействия в домене A1 vWF, содействуя адгезии тромбоцитов. Предполагается, что эндотелиальные клетки секретируют крупные полимерные формы vWF, а те формы vWF, которые имеют низкие молекулярные массы (низкомолекулярный vWF), возникают за счет протеолитического расщепления. Мультимеры с большими молекулярными массами накапливаются в тельцах Вейбеля-Палада эндотелиальных клеток и высвобождаются при стимуляции.

Снижение связывающей активности FVIII благодаря сниженным уровням белка vWF или уменьшению связывающей способности FVIII приводит к одному из трех типов болезни Виллебранда. Дополнительно или альтернативно, определенные типы болезни Виллебранда характеризуются повышением или снижением уровня Gp1ba - опосредованного связывания тромбоцитов, а именно типы 2А, 2В и 2М (обобщенные данные см. у Castaman et al., Disorders of Hemostasis 88(1):94-108 (2003)). Соответственно, модулирование взаимодействия vWF как с FVIII, так и с Gp1ba представляет собой целесообразную стратегию для лечения как гемофилии, так и болезни Виллебранда.

Учитывая биологическую важность vWF, существует постоянная необходимость в совершенствовании техники способов получения vWF для терапевтического применения. Общеизвестно, что vWF может быть выделен из эндогенных источников, таких как плазма крови человека. Выделенный vWF обла-

дает таким преимуществом, как высокая удельная активность в отношении выполнения его биологической функции и может, таким образом, эффективно применяться в качестве терапевтического белка для лечения соответствующих заболеваний, таких как болезнь Виллебранда. Как правило, vWF плазмы обладает удельной ристоцетиновой активностью, составляющей приблизительно 100 мЕ/мкг, однако выделение из плазмы крови человека имеет недостатки, так как, например, такая плазма может содержать различные вирусы, такие как ВИЧ и/или вирусы гепатита, которые могут переноситься пациенту. Кроме того, плазма представляет собой ограниченный ресурс и, таким образом, дефицит плазмы может приводить к проблематичности получения достаточного количества vWF для лечения. Соответственно, рекомбинантные способы получения vWF обладают преимуществами, разрешая некоторые проблемы, связанные с зависимостью от плазмы в качестве источника vWF. Для рекомбинантного получения была клонирована полноразмерная к ДНК vWF; указанный прополипептид соответствует аминокислотным остаткам 23-764 полноразмерного препро-vWF (Eikenboom et al. (1995) Haemophilia 1, 77-90).

К сожалению, vWF представляет собой молекулу, подвергающуюся сложным посттрансляционным модификациям. Кроме того, мультимеризация димеров vWF в большие и ультрабольшие мультимеры в аппарате Гольджи представляет собой сложную задачу при экспрессии в клетках млекопитающих. Так, экспрессия высокомолекулярного vWF в культуре клеток, например эндотелиальных клетках человека (первичных), зависит от специфического накопления ультрабольших молекул vWF в тельцах Вейбеля-Палада. Такие культуры клеток не подходят для получения терапевтических белков. Описаны и другие способы культивирования клеток; известно, что условия культивирования клеток могут влиять на продуцирование vWF различным образом. Например, показано, что высокие концентрации аммония ( $\text{NH}_4^+$ ) нарушают посттрансляционную модификацию.

Mayadas et al. (J. Biol. Chem., 264(23): 13497-13503, 1989) показали, что уровень аммония 25 мМ приводили к снижению мультимеризации vWF в эндотелиальных клетках, что также негативно влияет на удельную ристоцетиновую активность рекомбинантного vWF. Снижение мультимеризации, как правило, связано со снижением активности, в частности, удельной ристоцетиновой активности, рекомбинантного vWF.

До сих пор трудно предсказать, какие параметры могут положительно или отрицательно влиять на продуцирование того или иного белка, в особенности - сложных гликопротеинов, таких как фактор VIII и vWF. Например, показано, что определенные компоненты среды для клеточной культуры влияют на продуцирование фактора VIII. Согласно описанию в патенте США № 5804420 добавление полиола, меди и других следовых металлов может положительно влиять на выход фактора VIII. Также, согласно описанию в WO 2009/086309, показано, что применение меди в процессе культивирования клеток повышает выработку фактора VIII. У Mignot et al. (1989) описано также осуществление экспрессии vWF в рекомбинантных клетках CHO. Однако ни в одном из указанных примеров не содержится информации относительно удельной активности vWF или уровня его мультимеризации.

Белки ADAMTS (дезинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина I типа) представляют собой семейство металлопротеиназ, содержащих ряд консервативных доменов, включая цинк-зависимый каталитический домен, цистеин-богатый домен, дезинтегрин-подобный домен и по меньшей мере один, а в большинстве случаев множество повторов тромбоспондина типа I (для ознакомления см. Nicholson et al., BMC Evol. Biol. 2005 Feb 4;5(1):11). Указанные белки, эволюционно родственные семействам металлопротеиназ ADAM и MMP (Jones G.C., Curr. Pharm. Biotechnol. 2006 Feb;7(1):25-31), являются секретируемыми ферментами, для которых установлена связь с рядом заболеваний и состояний, включая тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП) (Moake J.L., Semin Hematol. 2004 Jan; 41(1):4-14), соединительнотканые расстройства, раковые заболевания, воспаление (Nicholson et al.) и тяжелую плазмодийную тропическую малярию (Larkin et al., PLoS Pathog. 2009 Mar; 5(3):e1000349). Из-за этих связей ферменты ADAMTS были признаны потенциальными мишенями для терапии ряда патологий (Jones G.C., Curr. Pharm. Biotechnol. 2006 Feb;7(1):25-31).

Соответственно, существует потребность в способах получения больших количеств белков ADAMTS, обладающих высокой удельной активностью, не содержащих загрязнителей, таких как вирусы, КТЭ и патогены типа бактерий Mycoplasma.

Один из представителей семейства ADAMTS, ADAMTS13, расщепляет фактор фон Виллебранда (vWF) между остатками Tyr 1605 и Met 1606; эта функция отвечает за разложение больших мультимеров vWF in vivo. Установлена связь потери активности ADAMTS 13 с некоторыми состояниями, такими как ТТП (Moake J.L., Semin Hematol. 2004 Jan; 41(1):4-14), острое и хроническое воспаление (Chauhan et al., J. Exp. Med. 2008 Sep 1;205(9):2065-74), и, совсем недавно, с тяжелой плазмодийной тропической малярией (Larkin et al., PLoS Pathog. 2009 Mar; 5(3):e1000349).

Протеаза ADAMTS 13 представляет собой гликозилированный белок массой 190 кДа, синтезируемый преимущественно в печени (Levy et al., Nature. 2001; 413:488-494; Fujikawa et al., Blood. 2001; 98:1662-1666; Zheng et al., J Biol Chem. 2001; 276:41059-41063; Soejima et al., J. Biochem. (Tokyo). 2001; 130:475-480; и Gerritsen et al., Blood. 2001; 98:1654-1661). В значительной степени кА и в случае с мультимерами rVWF высшего порядка, рекомбинантная экспрессия больших ADAMTS 13 в культурах клеток млекопитающих сопряжена с множеством трудностей.

Таким образом, существует необходимость в условиях культивирования клеток, в частности условиях культивирования при крупномасштабном производстве, обеспечивающих стабильный общий выход белка и/или стабильную общую и удельную активность продуцируемых белков в различных культурах клеток. Стабильность в культурах при крупномасштабных производственных процессах важна для производства терапевтических белков. Существует также необходимость в условиях культивирования клеток для крупномасштабного производства rVWF с уровнями мультимеризации и удельной ристоцетиновой активностью, сравнимыми или превышающими таковые VWF, присутствующего в нормальной плазме человека. Сходным образом, так как белки ADAMTS вовлечены в ряд заболеваний и состояний, в данной области техники существует потребность в способах крупномасштабного производства рекомбинантных белков ADAMTS, обладающих высокой удельной активностью, которые подходят для получения фармацевтических средств и для фармацевтического введения. Настоящее изобретение удовлетворяет указанные и другие потребности данной области техники в получении рекомбинантного фактора фон Виллебранда и рекомбинантного ADAMTS13.

#### Краткое описание изобретения

Согласно определенным аспектам настоящее изобретение основано на неожиданном открытии, заключающемся в том, что введение добавок в среды для клеточных культур, применяемые для экспрессии рекомбинантного фактора фон Виллебранда (rVWF) и рекомбинантного ADAMTS13 (rA13), приводит к значительному повышению экспрессии белков и ферментативной активности.

Настоящее изобретение касается способа получения культуральной жидкости клеток млекопитающего, содержащей высокомолекулярный рекомбинантный фактор фон Виллебранда (rVWF), отличающийся тем, что указанный способ включает этапы:

- a) обеспечения основной среды для культивирования клеток;
- b) добавления в указанную основную среду соли меди до конечной концентрации меди от 2,4 мкг/л до 20 мкг/л;
- c) обеспечения клеток млекопитающего, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую rVWF;
- d) непрерывного культивирования указанных клеток в среде, полученной на этапе b), в результате чего происходит экспрессия и секретирование rVWF указанными клетками в культуральную жидкость, причем концентрацию  $\text{NH}_4^+$  в указанной культуральной жидкости поддерживают на уровне ниже 4 мМ, а плотность клеток поддерживают на уровне менее чем  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл на протяжении всего этапа культивирования; и
- e) выделения по меньшей мере части указанной культуральной жидкости клеток, причем указанная выделенная культуральная жидкость имеет удельную ристоцетин-кофакторную активность rVWF, составляющую по меньшей мере 30 мЕ/мкг rVWF.

Вариантом настоящего изобретения является способ, дополнительно включающий добавление растительного гидролизата в основную среду на этапе a).

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, отличающийся тем, что указанный гидролизат представляет собой соевый гидролизат.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, отличающийся тем, что указанная основная среда представляет собой не содержащую животных белков культуральную среду.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, отличающийся тем, что указанная основная среда представляет собой не содержащую белков культуральную среду.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, отличающийся тем, что указанная основная среда представляет собой культуральную среду с заданным химическим составом.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, отличающийся тем, что конечная концентрация меди в основной среде составляет по меньшей мере 4 мкг/л.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, отличающийся тем, что конечная концентрация меди в основной среде составляет от 2,4 до 6 мкг/л меди.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, отличающийся тем, что клетки млекопитающего представляют собой клетки CHO.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, отличающийся тем, что непрерывное культивирование клеток осуществляют в хеостатическом режиме или в режиме перфузии.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, отличающийся тем, что клетки культивируют по меньшей мере в 100 л среды, полученной на этапе b).

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, отличающийся тем, что плотность клеток поддерживают на уровне менее чем  $2,0 \times 10^6$  клеток/мл на протяжении всего этапа культивирования.

Другим вариантом изобретения является способ, отличающийся тем, что плотность клеток поддерживают на уровне менее чем  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл на протяжении всего этапа культивирования.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, отличающийся тем, что отделенная культуральная жидкость имеет удельную ристоцетин-кофакторную активность rVWF, составляющую по меньшей мере 40 мЕ/мкг rVWF.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, отличающийся тем, что отделенная

культуральная жидкость имеет удельную ристоцетин-кофакторную активность rVWF, составляющую по меньшей мере 50 мЕ/мкг rVWF.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, отличающийся тем, что отделенная культуральная жидкость имеет удельную ристоцетин-кофакторную активность rVWF, составляющую по меньшей мере 60 мЕ/мкг rVWF.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, отличающийся тем, что отделенная культуральная жидкость имеет удельную ристоцетин-кофакторную активность rVWF, составляющую по меньшей мере 70 мЕ/мкг rVWF.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, отличающийся тем, что отделенная культуральная жидкость имеет удельную ристоцетин-кофакторную активность rVWF, составляющую по меньшей мере 80 мЕ/мкг rVWF.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, отличающийся тем, что культуральная жидкость содержит по меньшей мере 30% высокомолекулярных мультимеров VWF, состоящих более чем из 10 димеров, или содержит высокомолекулярные мультимеры VWF, состоящие из 14-22 димеров.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, отличающийся тем, что rVWF созекспрессируется с рекомбинантным фактором VIII (rFVIII).

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, дополнительно включающий этап очистки rVWF по меньшей мере от 50% rFVIII, присутствующего в отделенной культуральной жидкости.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, отличающийся тем, что отношение rVWF к rFVIII после очистки составляет по меньшей мере 10:1.

Другим вариантом изобретения является способ, где указанная соль меди выбрана из сульфата меди, ацетата меди, карбоната меди, хлорида меди, гидроксида меди, нитрата меди и оксида меди.

Другим вариантом настоящего изобретения является способ, где указанная соль меди представляет собой  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

Настоящее изобретение также касается культуральной жидкости клеток млекопитающего, содержащей rVWF и обладающей удельной ристоцетин-кофакторной активностью rVWF, составляющей по меньшей мере 30 мЕ/мкг rVWF, которая получена вышеуказанными способами.

Вариантом настоящего изобретения является культуральная жидкость, отличающаяся тем, что содержит рекомбинантный фактор VIII (rFVIII). Другим вариантом настоящего изобретения является культуральная жидкость в форме для фармацевтического введения.

#### Краткое описание чертежей

Фиг. 1 (1A) - электрофорез в агарозном геле низкого разрешения (1%) rVWF, экспрессируемого в культурах клеток млекопитающих в присутствии низкой (1,0 мкг/л) и высокой (4,3 мкг/л) концентраций меди, согласно описанию в примере 2. Отметим, что день культивирования 3 эквивалентен дню периодической культуры 1 из табл. 7 и 8. (1B) Относительное содержание мультимеров VWF, содержащих от 1 до 10 димеров (зона № 1) и более чем 10 димеров (зона № 2) согласно оценке зон, приведенных на фиг. 1 А, количественно определяли денситометрическим анализом;

фиг. 2 (2A) - интервальный график средней удельной активности rVWF в супернатантах клеточных культур rVWF, выращенных при высокой и низкой плотности клеток в присутствии высоких или низких уровней меди. (2B) Интервальный график средней концентрации  $\text{NH}_4^+$ , обнаруживаемой в супернатантах клеточных культур rVWF, выращенных при высокой и низкой плотности клеток в присутствии высоких или низких уровней меди;

фиг. 3 - супернатанты культур клеток, экспрессирующих рекомбинантный ADAMTS13 в присутствии возрастающих уровней меди, исследовали с применением анализа ДСН-ПААГ. После ДСН-ПААГ rA13 визуализировали с помощью (3A) окрашивания серебром и (3B) анти-A13 вестерн-блоттинга;

фиг. 4 - график зависимости объемной продуктивности (P Frets) от концентрации меди, показывающий экстраполированный (сплошная линия) эффект оптимальной концентрации меди на выработку rA13;

фиг. 5А-К - ступенчатые диаграммы при непрерывном суспензионном (хемостатическом) культивировании клеток, экспрессирующих rA13 на протяжении времени культивирования 8 недель, сравнивающие эффекты основных уровней меди (0,66 мкг/л) с таковыми в культурах, дополненных до конечной концентрации меди 2 мкг/л. Каждый столбец представляет среднее значение за неделю хемостатической культуры. Легенда относится к конкретным неделям, для которых представлены данные;

фиг. 6 (6A) - электрофорез в агарозном геле низкого разрешения (1%) rVWF, экспрессируемого в культурах клеток млекопитающих в присутствии низкой (1,0 мкг/л) и высокой (4,3 мкг/л) концентраций меди при высокой и низкой плотности клеток согласно описанию в примере 3. Следует отметить, что дни культивирования 8 и 17 ("CST8" и "CST17") эквивалентны дню 8 и дню 17 в табл. 10-13. (6B) Относительное содержание мультимеров VWF, содержащих от 1 до 10 димеров и более чем 10 димеров согласно оценке зон, приведенных на фиг. 6А, количественно определяли денситометрическим анализом.

#### Подробное описание изобретения

##### I. Введение.

Рекомбинантный vWF (rVWF) и рекомбинантный ADAMTS13 (rA13) могут быть получены посред-

ством экспрессии в крупномасштабных культурах клеток млекопитающих. Однако активность указанных белков при получении с применением стандартных условий культивирования клеток часто варьирует от культуры к культуре клеток, даже в тех случаях, когда общий состав сред неизменен; удельная активность рекомбинантных белков часто отличается от таковой vWF и гA13, полученных из плазмы крови. Кроме того, гVWF, экспрессируемый в культурах клеток млекопитающих, склонен образовывать белковые составы с низким (менее 10%) процентным содержанием мультимеров высшего порядка (мультимеры высшего порядка включают молекулы, содержащие более чем 10 димеров VWF). Эти недостатки стандартных способов получения гVWF и гA13 представляют особые сложности при создании культур для крупномасштабного производства (т.е. от 10 до более чем 20000-литровых культур).

Одним из потенциальных источников вариативности, часто наблюдаемой в разных партиях клеточной культур, является присутствие загрязнителей в компонентах сред для клеточных культур. Указанные загрязнители могут присутствовать в различном количестве в разных партиях, что приводит к варьирующим результатам при получении гVWF и гA13. После изучения различных загрязнителей, обнаруживаемых в различных добавках для клеточных культуральных сред, авторы настоящего изобретения обнаружили, что присутствие гидролизатов приводит к варьированию концентраций меди в таких культуральных средах. Дальнейшие исследования дали неожиданный результат: добавление меди в культуральные среды до получения общей концентрации меди, составляющей по меньшей мере от приблизительно 1 мкг/л до приблизительно 20 мкг/л, стабильно увеличивало общую и удельную активность гVWF и гA13 и/или также могло приводить к увеличению общего выхода белка. Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением предложены способы и композиции для высокопродуктивного получения гVWF и белков гA13 с высокой удельной активностью.

Согласно одному из аспектов в соответствии с настоящим изобретением предложены способы культивирования клеток и композиции для получения больших количеств гVWF и гA13, обладающих активностью, сравнимой или превышающей активность, проявляемую происходящим из плазмы vWF (pdVWF) или происходящим из плазмы ADAMTS13 (pdA13). Согласно дальнейшим аспектам белки гVWF и гA13, получаемые согласно настоящему изобретению, демонстрируют стабильно более высокую активность по сравнению с белками, получаемыми с применением стандартных способов культивирования клеток в средах без добавления меди или других добавок, подробно описываемых в настоящей заявке. Удачным образом, согласно определенным вариантам реализации описанных в настоящей заявке способов и композиций, белки гVWF и гA13, полученные согласно настоящему изобретению, проявляют стабильно более высокую удельную активность (т.е. Е/мг белка) по сравнению с белками, полученными с применением стандартных способов культивирования клеток в средах без добавления меди или других добавок, подробно описываемых в настоящей заявке. Сходным образом, предложенные в соответствии с настоящим изобретением способы получения гVWF и гA13 дают больший выход активности на объем культуры (т.е. Е/л/день), по сравнению со стандартными способами культивирования клеток с применением сред без добавления меди или других добавок, подробно описываемых в настоящей заявке.

Согласно еще одному аспекту в соответствии с настоящим изобретением предложены способы культивирования клеток, согласно которым в основную среду для клеточной культуры добавляют медь до получения общей концентрации, составляющей по меньшей мере приблизительно 1 мкг/л. Согласно другим вариантам реализации в основную среду для клеточной культуры добавляют медь до получения общей концентрации, составляющей по меньшей мере приблизительно 2 мкг/л. Согласно другим вариантам реализации в основную среду для клеточной культуры добавляют медь до получения общей концентрации, составляющей по меньшей мере от приблизительно 1 мкг/л до приблизительно 20 мкг/л. Согласно некоторым вариантам реализации общая концентрация меди составляет приблизительно 1,5-4,5 мкг/л. Согласно определенным вариантам реализации в среду для клеточной культуры добавляют медь до получения приблизительно 1; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8; 2,0; 2,2; 2,4; 2,6; 2,8; 3; 3,2; 3,4; 3,6; 3,8; 4; 4,2; 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20 мкг/л меди или более. Основные среды для клеточных культур как правило, содержат следовые концентрации меди менее 1 мкг/л.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены способы культивирования клеток, согласно которым в основную среду для клеточной культуры добавляют от приблизительно 1,0 до приблизительно 20 мкг/л меди для продуцирования гVWF. Согласно дальнейшим вариантам реализации в основную среду для клеточной культуры добавляют приблизительно 1,5-15; 2,0-10; 2,5-8; 3,0-6; 4,0-5,0 мкг/л меди для продуцирования гVWF. Согласно дальнейшим вариантам реализации указанная основная среда для клеточной культуры может, помимо добавленной меди, также содержать один или более гидролизат.

Согласно другим вариантам реализации настоящее изобретение обеспечивает способы культивирования клеток, согласно которым в основную среду для клеточной культуры добавляют от приблизительно 1,5 до приблизительно 4 мкг/л меди для продуцирования гA13. Согласно дальнейшим вариантам реализации в основную среду для клеточной культуры добавляют приблизительно 1,6-3,8; 1,7-3,6; 1,8-3,4; 1,9-3,2; 2,0-3,0; 2,1-2,8; 2,2-2,6; 2,3-2,4 мкг/л меди для продуцирования гA13. Согласно дальнейшим вариантам реализации указанная основная среда для клеточной культуры может, помимо добавленной меди, также содержать один или более гидролизат. Согласно дальнейшим вариантам реализации указанная

основная среда для клеточной культуры включает, помимо меди и/или одного или более гидролизата, от приблизительно 1,0 до приблизительно 30 мкМ цинка. Согласно дальнейшим вариантам реализации указанная основная среда для клеточной культуры также содержит, помимо меди и/или одного или более гидролизата и/или цинка, приблизительно от 0,5 до приблизительно 5,0 мМ кальция.

Согласно дальнейшему аспекту и в соответствии со всеми вышеизложенными, в соответствии с настоящим изобретением предложены способы культивирования клеток, согласно которым уровни аммония в растворе культуры клеток являются низкими (менее 10 мМ). Согласно определенным вариантам реализации в способах культивирования клеток согласно настоящему изобретению применяют среды для клеточных культур, содержащие более 1, 2, 3, 4 или 5 мкг/л меди в комбинации с низкими уровнями аммония.

Одним из преимуществ способов и композиций согласно настоящему изобретению является то, что они подходят для крупномасштабного культивирования клеток. Объем указанных крупномасштабных культур клеток составляет по меньшей мере 10, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 5000, 10000 или 20000 л.

Согласно определенным аспектам способы согласно настоящему изобретению не обязательно приводят к получению большего суммарного количества рекомбинантного белка, однако получаемый рекомбинантный белок (rVWF или rA13) демонстрирует более высокую общую и удельную активность, чем обнаруживаемая у белков, полученных с применением стандартных клеточных культур, в частности, по сравнению с белками, полученными в таких культурах клеток, где среда для клеточной культуры не содержит дополнительных добавок меди. Согласно дальнейшим аспектам белки rVWF и rA13, полученные из клеток, культивируемых в средах с добавлением меди, демонстрируют стабильно повышенную активность на литр культуры клеток по сравнению с клетками, культивируемыми в основных средах для клеточных культур без добавления меди. Согласно дальнейшим аспектам добавление в среды меди согласно настоящему изобретению приводит к повышению выхода белка, увеличению числа клеток в культуре и/или повышению общей активности на литр культуры по сравнению со средами без добавления меди.

Дальнейшие преимущества способов и композиций согласно настоящему изобретению заключаются в получении популяции белков с высоким процентным содержанием (более 10%) высокомультимеризованного rVWF.

Хотя значительная часть обсуждения белков ADAMTS в настоящей заявке относится к ADAMTS 13 (A13), необходимо понимать, что, так как все белки ADAMTS имеют общую структуру центрального домена и общие структурно-функциональные связи, способы и композиции, описанные в настоящей заявке, применимы для получения любых белков ADAMTS, не ограничиваясь rA13.

#### I. Определения.

Используемый в настоящей заявке термин "рекомбинантный vWF" включает vWF полученный с применением технологии рекомбинантной ДНК. Согласно определенным вариантам реализации белки vWF согласно настоящему изобретению могут содержать конструкцию, полученную, например, согласно WO 1986/06096, опубликованной 23 окт. 1986 г., и заявке на патент США сер. № 07/559509, поданной 23 июля 1990г. от имени Ginsburg et al., включенных в настоящую заявку посредством ссылки в отношении способов получения рекомбинантного vWF. vWF согласно настоящему изобретению может включать все потенциальные формы, в том числе мономерные и мультимерные формы. Необходимо также понимать, что настоящее изобретение охватывает применение комбинаций разных формы vWF. Например, vWF согласно настоящему изобретению может включать разные мультимеры, разные производные; как активные биологически производные, так и не активные биологические производные.

Термин "рекомбинантный" при использовании, например, в отношении клетки или нуклеиновой кислоты, белка или вектора, означает, что указанная клетка, нуклеиновая кислота, белок или вектор модифицированы введением гетерологичной(ного) нуклеиновой кислоты или белка, либо изменением нативной(ного) нуклеиновой кислоты или белка, или что указанная клетка получена из модифицированной таким образом клетки. Таким образом, например, рекомбинантные клетки экспрессируют гены, не обнаруживаемые в нативных (не-рекомбинантных) формах указанных клеток или экспрессируют нативные гены, которые в противном случае экспрессируются аномально, экспрессируются недостаточно или не экспрессируются вообще.

В контексте настоящего изобретения "рекомбинантный vWF" охватывает любые члены семейства vWF, например от млекопитающих, таких как приматы, человек, обезьяна, кролик, свинья, грызуны, мышь, крыса, хомяк, песчанка, собачьи, кошачьи; и их биологически активные производные. Согласно предпочтительному варианту реализации рекомбинантный VWF представляет собой VWF человека. Мультимерные и варианты белки vWF, обладающие активностью, также включены, как и функциональные фрагменты и гибриды белков vWF. Кроме того, vWF согласно настоящему изобретению могут также содержать метки, облегчающие очистку или определение, или и то, и другое. vWF, описанные в настоящей заявке, могут также быть модифицированы терапевтическим агентом или агентом, подходящим для визуализации *in vitro* или *in vivo*.

Термины "высокомультимерный vWF", "высокомолекулярный vWF" и "HMW VWF" могут исполь-

зоваться взаимозаменяемо и относятся к ковалентно связанным мультимерам vWF, содержащим более чем 10 димеров VWF. Согласно определенным вариантам реализации HMW VWF содержит по меньшей мере 11 димеров VWF или по меньшей мере 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или более димеров VWF.

Используемый в настоящей заявке термин "белок ADAMTS" относится к полипептиду - дезинтегрину и металлопротеиназе из семейства металлопротеиназ с мотивами тромбоспондина I типа. Члены указанного семейства включают белки человека

ADAMTS1 (NM\_006988), ADAMTS2 (NM\_014244; NM\_021599), ADAMTS3 (NM\_014243), ADAMTS4 (NM\_005099), ADAMTS5 (NM\_007038), ADAMTS6 (NM\_014273), ADAMTS7 (NM\_0142727), ADAMTS8 (NM\_007037), ADAMTS9 (NM\_182920; NM\_182921; NM\_020249), ADAMTS10 (NM\_030957), ADAMTS12 (NM\_030955), ADAMTS13 (NM\_139025; NM\_139026; NM\_139027; NM\_139028), ADAMTS14 (NM\_139155; NM\_080722), ADAMTS15 (NM\_139055), ADAMTS16 (NM\_139056), ADAMTS17 (NM\_139057), ADAMTS18 (NM\_199355; NM\_139054), ADAMTS19 (NM\_133638) и ADAMTS20 (NM\_025003, NM\_175851). Белки ADAMTS

включают и полноразмерные белки, и неполные полипептиды, которые проявляют по меньшей мере частичную биологическую активность, например, по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более, от активности, демонстрируемой полноразмерным белком, в частности, протеазной активности, демонстрируемой полноразмерным белком. В определенных случаях белок ADAMTS подвергается посттрансляционной модификации *in vivo* или *in vitro*, например, ферментативным или химическим путем. Понятно, что белки ADAMTS согласно настоящему изобретению включают изоформы альтернативного сплайсинга, консервативно модифицированные белки, идентичные, по существу, белки, гомологи и т.п.

В контексте настоящего изобретения термин "белок ADAMTS" охватывает любые члены семейства ADAMTS, происходящие, например, из млекопитающих, таких как приматы, человек, обезьяна, кролик, свинья, грызуны, мышь, крыса, хомяк, песчанка, собаки, кошки, и их биологически активные производные. Мутантные и варианты белки ADAMTS, обладающие активностью, также включены, как и функциональные фрагменты и гибриды белков ADAMTS. Кроме того, белки ADAMTS согласно настоящему изобретению могут также содержать метки, облегчающие очистку или определение, или и то, и другое. Белки ADAMTS, описанные в настоящей заявке, могут также быть модифицированы терапевтическим агентом или агентом, подходящим для визуализации *in vitro* или *in vivo*.

Используемый в настоящей заявке термин "белок ADAMTS13" относится к любому белку или полипептиду, обладающему активностью ADAMTS13, в частности способностью расщеплять пептидную связь между остатками Тир-842 и Мет-843 в VWF. Согласно типовому варианту реализации "белок ADAMTS13" относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность, в значительной степени сходную с таковой NP\_620594 (изоформа 1 ADAMTS13, препробелок) или аминокислотами 75-1427 NP\_620594 (изоформа 1 ADAMTS13, зрелый полипептид). Согласно другому варианту реализации "белок ADAMTS13" относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность, в значительной степени сходную с таковой NP\_620596 (изоформа 2 ADAMTS13, препробелок) или аминокислотами 75-1371 NP\_620594 (изоформа 2 ADAMTS13, зрелый полипептид). Согласно еще одному из вариантов реализации ADAMTS13 белки включают полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, в значительной степени сходную с таковой NP\_620595 (изоформа 3 ADAMTS13, препробелок) или аминокислотами 75-1340 NP\_620595 (изоформа 1 ADAMTS13, зрелый полипептид). Используемый в настоящей заявке термин "белок ADAMTS13" включает природные варианты, обладающие vWF-расщепляющей активностью, и искусственные конструкции, обладающие vWF-расщепляющей активностью. Согласно применению в настоящем описании "ADAMTS13" охватывает любые природные варианты, альтернативные последовательности, изоформы или мутантные белки, сохраняющие некоторую степень основной активности. Примеры мутаций ADAMTS13, обнаруживаемые в популяциях человека, включают без ограничений R7W, V88M, H96D, R102C, R193W, T196I, H234Q, A250V, R268P, W390C, R398H, Q448E, Q456H, P457L, C508Y, R528G, P618A, R625H, I673F, R692C, A732V, S903L, C908Y, C951G, G982R, C1024G, A1033T, R1095W, R1123C, C1213Y, T1226I, G1239V, R1336W, для многих из которых показана связь с тромботической тромбоцитопенической пурпурой (ТТП). Белки ADAMTS13 также включают полипептиды, содержащие посттрансляционные модификации. Например, показано, что ADAMTS13 модифицируется N-ацетилглюкозамином (GlcNAc) по остаткам 614, 667 и 1354, и предсказано, что остатки 142, 146, 552, 579, 707, 828 и 1235 могут также модифицироваться таким образом.

Протеолитически активный рекомбинантный ADAMTS13 может быть получен посредством осуществления экспрессии в культурах клеток млекопитающих, согласно описанию у Plaimauer et al. (2002, Blood. 15;100(10):3626-32) и в US 2005/0266528, раскрытия которых включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте для любых целей. Способы экспрессии рекомбинантного ADAMTS13

в культуре клеток описаны у Plaimauer B, Scheifflinger F. (Semin Hematol. 2004 Jan; 41(1):24-33 и в US 2011/0086413, раскрытия которых включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте для любых целей.

Используемый в настоящей заявке термин "биологически активное производное" при использовании в контексте белка ADAMTS охватывает также полипептиды, полученные с применением технологии рекомбинантной ДНК, что может включать любые известные в данной области техники способы (i) получения рекомбинантной ДНК посредством методов генной инженерии, например, посредством обратной транскрипции РНК и/или амплификации ДНК, (ii) введения рекомбинантной ДНК в прокариотические или эукариотические клетки путем трансфекции, т.е. электропорацией или микроинъекцией, (iii) культивирования указанных трансформированных клеток, например, в непрерывном или периодическом режиме, (iv) экспрессии белка ADAMTS, например, конститутивного или индуцируемого, и (v) выделения указанного белка ADAMTS, например, из культуральной среды или путем сбора трансформированных клеток, (vi) получения существенно очищенного рекомбинантного белка ADAMTS, например, с помощью ионообменной хроматографии, эксклюзионной хроматографии, аффинной хроматографии, хроматографии с гидрофобным взаимодействием и т.п. Термин "биологически активное производное" включает также гибридные молекулы, такие как, например, белок ADAMTS или его функциональный фрагмент, скомбинированный с вторым полипептидом, например, доменом Fc иммуноглобулина или альбуминовым доменом, для улучшения биологических/фармакологических параметров, таких как, например, период полужизни белка ADAMTS в кровотоке млекопитающего, в частности, человека.

Термины "выделенный", "очищенный" или "биологически чистый" относятся к веществу, практически или по существу не содержащему компонентов, обычно сопутствующих ему в естественном состоянии. Чистоту и гомогенность, как правило, определяют с применением техник аналитической химии, таких как электрофорез в полиакриламидном геле или жидкостная хроматография высокого разрешения. Согласно одному из вариантов реализации rVWF представляет собой преобладающий компонент в существенно очищенном составе. Согласно другому варианту реализации gA13 представляет собой преобладающий компонент в существенно очищенном составе. Термин "очищенный" согласно некоторым вариантам реализации означает, что нуклеиновая кислота или белок дают по существу одну полосу в электрофоретическом геле. Согласно другим вариантам реализации это означает, что чистота указанной(ого) нуклеиновой кислоты или белка составляет по меньшей мере 50%, более предпочтительно - по меньшей мере 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или более. "Чистота" или "очистка" согласно другим вариантам реализации означает удаление по меньшей мере одного загрязнителя из подвергаемой очистке композиции.

В этом смысле очистка не подразумевает, что очищенное соединение будет гомогенным, например, чистым на 100%.

Биологическая активность vWF может быть измерена посредством известных методов анализа *in vitro*. Например, ристоцетин-кофакторный анализ основан на агглютинации свежих или фиксированных формалином тромбоцитов, индуцированной антибиотиком ристоцетином в присутствии vWF. Степень агглютинации тромбоцитов зависит от концентрации vWF и может быть измерена турбидиметрическим методом, например, с применением агрегометра (Weiss et al., J. Clin. Invest. 52: 2708-2716, 1973; Macfarlane et al., Thromb. Diath. Haemorrh. 34: 306-308, 1975). В настоящей заявке удельную ристоцетин-кофакторную активность vWF согласно настоящему изобретению выражают в мЕ/мкг vWF согласно оценке с применением методов анализа *in vitro*.

Используемый в настоящей заявке термин "одна единица активности ADAMTS" означает уровень активности в 1 мл смешанной нормальной плазмы человека, независимо от того, какой метод анализа применяют. Например, в том случае, если белок ADAMTS представляет собой ADAMTS13, одна единица активности ADAMTS13 FRETS-VWF73 представляет собой уровень активности, необходимый для расщепления такого же количества субстрата FRETS-VWF73 (Kokame et al., Br. J. Haematol. 2005 Apr; 129(1):93-100), которое расщепляется одним мл смешанной нормальной плазмы человека. Удобно, что активность ADAMTS13 может быть определена методами функционального анализа, такими как функциональный анализ с применением модифицированных пептидов фактора фон Виллебранда в качестве субстрата ADAMTS13 (Tripodi et al., J. Thromb. Haemost. 2008 Sep;6(9):1534-41). Предпочтительный способ определения активности рекомбинантного ADAMTS13 человека описан у Gerritsen et al. (Assay of von Willebrand factor (vWF)-cleaving protease based on decreased collagen binding affinity of degraded vWF: a tool for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) ("Анализ протеазы, расщепляющей фактор фон Виллебранда (vWF), основанный на понижении коллаген-связывающей способности деградированного vWF: инструмент для диагностики тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП)"). Thromb Haemost 1999; 82: 1386-1389). Согласно одному из вариантов реализации, чтобы считаться белком ADAMTS13 согласно приведенному выше определению, полипептид или белок должен обладать по меньшей мере 1% vWF-расщепляющей активности нативного ADAMTS13. Согласно другим вариантам реализации белок ADAMTS13 обладает по меньшей мере 10% активности нативного ADAMTS13. Согласно другим вариантам реализации белок ADAMTS13 обладает по меньшей мере 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% активности нативного ADAMTS13. Количество белка ADAMTS13

также может быть определено измерением антигена ADAMTS13, например, с применением метода ИФА (ELISA), описанного у Rieger et al. (2006, *Thromb. Haemost.* 2006 95(2):212- 20). В данной области техники общепризнано, что 1 мл смешанной нормальной плазмы человека содержит 1 мкг ADAMTS13. Таким образом, согласно общепринятому в данной области техники правилу 1 мкг полученного из плазмы ADAMTS13 обладает одной единицей активности ADAMTS13.

Термины "раствор культуры клеток", "среда или среды для клеточной культуры" и "супернатант культуры клеток" относятся к аспектам процессов культивирования клеток, как правило, общеизвестным в данной области техники. В контексте настоящего изобретения раствор культуры клеток может включать среды для клеточных культур и супернатант культуры клеток. Указанные среды для клеточных культур вводят в раствор культуры клеток извне, необязательно вместе с добавками, для обеспечения питательных веществ и других компонентов для культивирования клеток, экспрессирующих gVWF или gA13. Термин "супернатант культуры клеток" относится к раствору культуры клеток, содержащему питательные вещества и другие компоненты из среды для клеточной культуры, а также продукты, высвобождаемые, метаболизируемые и/или экскретируемые клетками во время культивирования, но не сами клетки. Таким образом, согласно одному контексту "супернатант культуры клеток" может относиться к жидкой фазе раствора культуры клеток (т.е. к раствору культуры клеток, исключая клетки). Например, концентрация аммония культурального супернатанта, как правило, относится к концентрации аммония в растворе культуры клеток. Согласно другим контекстам "супернатант культуры клеток" относится к раствору культуры клеток, из которого указанные клетки были извлечены (т.е. отделенному супернатанту культуры клеток).

Используемые в настоящей заявке термины "витамин B3", "никотинамид", "ниацинамид", "ниацин" и "никотиновая кислота" могут использоваться взаимозаменяемо, относясь к любому члену семейства витаминов B3. Соответственно, любой член указанного семейства может быть использован для добавления в среду, применяемую в способах согласно настоящему изобретению.

Используемый в настоящей заявке термин "среда с заданным химическим составом" или "среды с заданным химическим составом" относится к синтетической ростовой среде, все компоненты которой идентифицированы и их концентрации известны. Среды с заданным химическим составом не содержат бактериальных, дрожжевых, животных или растительных экстрактов, хотя они могут включать или не включать отдельные компоненты растительного или животного происхождения (например, белки, полипептиды, и т.п.). Неограничивающие примеры коммерчески доступных сред с заданным химическим составом включают различные модифицированные по Дульбекко среды Игла (DME) (Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc), питательную смесь Хэма (Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc), их комбинации, и т.п. Способы получения культуральных сред с заданным химическим составом известны в данной области техники, например, в патентах США № 6171825 и 6936441, WO 2007/077217 и опубликованных заявках на патент США № 2008/0009040 и 2007/0212770, раскрытия которых включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте для любых целей.

Используемый в настоящей заявке термин "не содержащая олигопептидов культуральная среда" или "не содержащие олигопептидов культуральные среды" относится к не содержащей белков среде, которая не содержит олигопептиды, такие как, например, олигопептиды, полученные из белкового гидролизата. Согласно одному из вариантов реализации указанная среда не содержит олигопептиды, состоящие из двадцати или более аминокислот. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, указанная среда не содержит олигопептиды, содержащие пятнадцать или более аминокислот. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения указанная среда не содержит олигопептиды, содержащие десять или более аминокислот. Согласно одному варианту реализации указанная среда не содержит олигопептиды, содержащие семь или более аминокислот. Согласно другому варианту реализации указанная среда не содержит олигопептиды, содержащие пять или более аминокислот. Согласно еще одному варианту реализации указанная среда не содержит олигопептиды, содержащие три или более аминокислоты. Согласно дальнейшему варианту реализации настоящего изобретения указанная среда не содержит олигопептиды, содержащие две или более аминокислоты. Способы получения не содержащих олигопептидов культуральных сред известны в данной области техники, например в патентах США № 6171825 и 6936441, WO 2007/077217, и опубликованных заявках на патент США №2008/0009040 и 2007/0212770, раскрытия которых включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте для любых целей.

Используемый в настоящей заявке термин "бессывороточная культуральная среда" или "бессывороточные культуральные среды" относится к культуральной среде без добавления животной сыворотки. Несмотря на то, что зачастую бессывороточные среды представляют собой среды с заданным химическим составом, в бессывороточные среды могут быть добавлены отдельные животные или растительные белки или белковые фракции. Способы получения бессывороточных культуральных сред известны в данной области техники, например, в патентах США № 6171825 и 6936441, WO 2007/077217, и опубликованных заявках на патент США № 2008/0009040 и 2007/0212770, раскрытия которых включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте для любых целей.

Используемый в настоящей заявке термин "не содержащая животных белков культуральная среда"

или "не содержащие животных белков культуральные среды" относится к культуральной среде без добавления животной сыворотки, белка или фракции белка. Хотя зачастую не содержащие животных белков культуральные среды представляют собой среды с заданным химическим составом, не содержащие животных белков культуральные среды могут содержать растительные или дрожжевые гидролизаты. Способы получения не содержащих животных белков культуральных сред известны в данной области техники, например, в патентах США № 6171825 и 6936441, WO 2007/077217, и опубликованных заявках на патент США № 2008/0009040 и 2007/0212770, раскрытия которых включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте для любых целей.

Используемый в настоящей заявке термин "основная (базовая) среда для клеточной культуры" или "основные (базовые) среды для клеточных культур" относятся к культуральной среде с заданным химическим составом, не содержащей олигопептидов культуральной среде, бессывороточной культуральной среде или не содержащей животных белков культуральной среде, в которую не был добавлен гидролизат, например, растительный или дрожжевой гидролизат. Основные среды общеизвестны в данной области техники, например DMEM, Хэма F12, DMEM/Хэма F12, среда 199, McCoу или RPMI. Указанная основная среда может включать ряд ингредиентов, в том числе аминокислоты, витамины, органические и неорганические соли, и источники углеводов. Каждый ингредиент может присутствовать в количестве, обеспечивающем культивирование клетки; такие количества общеизвестны специалистам в данной области техники. Указанная среда может включать вспомогательные вещества, такие как буферные вещества, например, бикарбонат натрия, антиоксиданты, стабилизаторы для противодействия механическому напряжению или ингибиторы протеазы. При необходимости, могут быть добавлены неионогенные ПАВ, такие как сополимеры и/или смеси полиэтиленгликолей и полипропиленгликолей.

## II. Среда для клеточных культур и супернатант культуры клеток.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к средам для клеточных культур для получения rVWF и/или гA13, обладающих повышенной активностью по сравнению с rVWF и гA13, полученных с применением основных сред для клеточных культур. Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к средам для клеточных культур для получения rVWF и/или гA13, в которых в основные среды для клеточных культур добавляют одно или более дополнительное вещество. Согласно конкретным вариантам реализации и приведенному ниже более подробному описанию условия культивирования клеток согласно настоящему изобретению включают основные среды для клеточных культур, в которые добавлена медь до концентрации по меньшей мере 1,0 мкг/л. Согласно дальнейшим вариантам реализации применяемые среды для клеточных культур и супернатанты, полученные с помощью процессов согласно настоящему изобретению, также содержат низкие уровни (менее 10 мМ) аммония. Согласно конкретному варианту реализации условиями культивирования клеток, применяемыми для экспрессии rVWF и/или гA13, управляют таким образом, чтобы поддерживать в супернатанте культуры клеток низкий уровень аммония, т.е. менее чем 10 мМ и, предпочтительно, менее чем 5 мМ.

Культуральная среда согласно настоящему изобретению могут быть основаны на подходящих основных средах, общеизвестных в данной области техники, таких как DMEM, Хэма F12, DMEM/Хэма F12, среда 199, McCoу или RPMI. Основная среда может включать ряд ингредиентов, включая аминокислоты, витамины, органические и неорганические соли, и источники углеводов. Каждый ингредиент может присутствовать в количестве, содействующем культивированию клетки; такие количества, как правило, известны специалистам в данной области техники. Указанная среда может включать вспомогательные вещества, такие как буферные вещества, например бикарбонат натрия, антиоксиданты, стабилизаторы для противодействия механическому стрессу, или ингибиторы протеазы. При необходимости может быть добавлено неионогенное ПАВ, например, сополимеры и/или смеси полиэтиленгликолей и полипропиленгликолей.

Как правило, основные среды содержат менее чем 1 мкг/л меди - например, среда DMEM/Хэма F12 содержит медь в концентрации приблизительно 0,3 мкг/л. Такие концентрации меди не обеспечивают достаточного количества ионов меди для поддержания продуцирования белков rVWF и гA13 согласно настоящему изобретению, которые проявляют высокую удельную активность.

Медь может быть введена в среды для клеточных культур согласно настоящему изобретению с помощью различных способов, например, введением добавки в среду. Согласно некоторым вариантам реализации указанная добавка в культуральную среду может содержать гидролизат, который можно применять для повышения концентрации меди в указанной среде. Гидролизаты могут включать любой гидролизат из общеизвестных в данной области техники, таких как растительные гидролизаты, соевые гидролизаты и гидролизат пшеничной клейковины. Согласно определенным вариантам реализации добавление гидролизата может способствовать повышенной концентрации меди, от приблизительно 0,2 до приблизительно 10 мкг/л  $\text{Cu}^{2+}$ . Согласно некоторым вариантам реализации количество меди, обеспеченное гидролизатом, может зависеть от количества меди в указанном гидролизате, а также количества добавленного гидролизата.

Содержание меди в гидролизате может быть определено элементным анализом, например адсорбционной атомной спектроскопией (GFAA: атомной абсорбцией в графитовой печи), или масс-спектрометрическими методами (например, ИСП-МС).

Согласно определенным вариантам реализации медь может вводиться в культуральные среды, сама по себе или вместе с гидролизатом, путем введения средовой добавки, включая подходящую соль меди или хелат меди. Подходящая соль меди может включать, не ограничиваясь перечисленными, сульфат меди, ацетат меди, карбонат меди, хлорид меди, гидроксид меди, нитрат меди и оксид меди. Подходящие хелаторы меди могут включать, не ограничиваясь перечисленными, альбумин, этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), полиаминовые хелатирующие агенты, этилендиамин, диэтилентриамин, триэтилентетрамин, триэтилендиамин, тетраэтиленпентамин, аминоэтилэтанолламин, аминоэтилпиперазин, пентаэтиленгексамин, триэтилентетрамин-гидрохлорид, тетраэтиленпентамин-гидрохлорид, пентаэтиленгексамин-гидрохлорид, тетраэтилпентамин, каптоприл, пеницилламин, N,N'-бис(3-аминопропил)-1,3-пропандиамин, N,N'-бис(2-аминоэтил)-1,3-пропандиамин, 1,7-диокса-4,10-диазаацклододекан, 1,4,8,11-тетраазаацклотетрадекан-5,7-дион, 1,4,7-триазаацклононана тригидрохлорид, 1-окса-4,7,10-триазаацклододекан, 1,4,8,12-тетраазаацклопентадекан и 1,4,7,10-тетраазаацклододекан.

Согласно определенным вариантам реализации в основные среды для клеточных культур добавляют медь до получения общей концентрации меди от приблизительно 1,0 до приблизительно 20 мкг/л. Согласно конкретному варианту реализации в основные клеточные среды добавляют медь до конечной концентрации от приблизительно 1,0 до приблизительно 10 мкг/л. Согласно дальнейшим вариантам реализации в основные среды для клеточных культур добавляют медь до получения конечной концентрации приблизительно 1,0-5,0; 1,2-4,0; 1,3-3,0; 1,4-2,9; 1,5-2,8; 1,6-2,7; 1,7-2,6; 1,8-2,5; 1,9-2,4; 2,0-2,3; 2,1-2,2 мкг/л меди. Согласно дальнейшим вариантам реализации основные среды для клеточных культур, применяемые в способах согласно настоящему изобретению, дополняют до получения концентраций меди приблизительно 1,2-9,5; 1,4-9; 1,6-8,5; 1,8-8; 2,0-7,5; 2,2-7; 2,4-6,5; 2,6-6,0; 2,8-5,5; 3,0-5,0; 3,2-4,5; 3,4-4; и 2-4 мкг/л. Согласно другим вариантам реализации основные среды для клеточных культур, применяемые в способах согласно настоящему изобретению, дополняют до получения концентраций меди приблизительно 1-6, 2-5, 3-4 мкг/л. Согласно одному из вариантов реализации в основные среды для клеточных культур добавляют медь до получения общей концентрации меди, составляющей по меньшей мере 1 мкг/л. Согласно другому варианту реализации в основные среды для клеточных культур добавляют медь до получения общей концентрации меди, составляющей по меньшей мере 2 мкг/л. Согласно еще одному из вариантов реализации в основные среды для клеточных культур добавляют медь до получения общей концентрации меди, составляющей по меньшей мере 4 мкг/л. Согласно определенным вариантам реализации в основные среды для клеточных культур добавляют медь до получения общей концентрации меди, составляющей по меньшей мере 1 мкг/л, или по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 мкг/л меди или более. Согласно определенным вариантам реализации и более подробному описанию ниже в настоящей заявке культуры для получения rA13 могут содержать приблизительно 2-4 мкг/л меди, тогда как культуры для получения rVWF могут содержать по меньшей мере 2 мкг/л меди.

Вышеуказанные концентрации представляют собой относительные концентрации чистой меди в форме двухвалентного иона меди ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Если используется производное меди, например, гидратированная соль, или соединение, содержащее медь, например хелатор меди, указанное количество производного или хелатора добавляют таким образом, что конечная концентрация меди попадает в указанные в настоящей заявке диапазоны. Например, 2 мкг/л  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  эквивалентны концентрации меди, составляющей приблизительно 0,51 мкг/л (без сульфата и  $5\text{H}_2\text{O}$ ).

Удачным образом, было обнаружено, что применение в процессе культивирования клеток среды для клеточной культуры, обеспечивающей низкие концентрации ( $\text{NH}_4^+$ ) в растворе культуры клеток (т.е. в культуральном супернатанте), приводит к экспрессии рекомбинантного VWF и/или rA13 с более высокой удельной активностью. Соответственно, согласно определенным вариантам реализации концентрация  $\text{NH}_4^+$  в указанном супернатанте составляет не более чем 10 мМ. Согласно предпочтительному варианту реализации концентрация  $\text{NH}_4^+$  в указанном супернатанте составляет не более чем 5 мМ. Согласно предпочтительному варианту реализации концентрация  $\text{NH}_4^+$  в указанном супернатанте составляет не более чем 4 мМ. Согласно другим вариантам реализации концентрация  $\text{NH}_4^+$  в указанном супернатанте составляет не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 мМ или менее.

Соответственно, согласно определенным вариантам реализации способы и композиции, предложенные в соответствии с настоящим изобретением, основаны на применении основных сред для клеточных культур с добавлением меди (например, до конечной концентрации, составляющей меньшей мере 2 мкг/л) для применения в процессе, который приводит к концентрации  $\text{NH}_4^+$  в супернатанте, составляющей не более 10 мМ. Согласно другим вариантам реализации основную среду для клеточной культуры дополняют для получения конечных концентраций меди и аммония согласно любому из вариантов 1-440, приведенных в табл. 1.

Таблица 1. Типовые варианты концентраций меди и аммония в культуральных средах и супернатанте, подходящих для экспрессии рекомбинантных белков согласно описанию

|                   |                             | Концентрация аммония |             |            |             |             |             |             |             |             |             |             |
|-------------------|-----------------------------|----------------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                   |                             | Н.О.                 | НБЧ<br>10мМ | НБЧ<br>9мМ | НБЧ<br>8мМ  | НБЧ<br>7мМ  | НБЧ<br>6мМ  | НБЧ<br>5мМ  | НБЧ<br>4мМ  | НБЧ<br>3мМ  | НБЧ<br>2мМ  | НБЧ<br>1мМ  |
| Концентрация меди | ПММ<br>1 мкг/л              | Вар.<br>1            | Вар.<br>41  | Вар.<br>81 | Вар.<br>121 | Вар.<br>161 | Вар.<br>201 | Вар.<br>241 | Вар.<br>281 | Вар.<br>321 | Вар.<br>361 | Вар.<br>401 |
|                   | ПММ<br>2 мкг/л              | Вар.<br>2            | Вар.<br>42  | Вар.<br>82 | Вар.<br>122 | Вар.<br>162 | Вар.<br>202 | Вар.<br>242 | Вар.<br>282 | Вар.<br>322 | Вар.<br>362 | Вар.<br>402 |
|                   | ПММ<br>3 мкг/л              | Вар.<br>3            | Вар.<br>43  | Вар.<br>83 | Вар.<br>123 | Вар.<br>163 | Вар.<br>203 | Вар.<br>243 | Вар.<br>283 | Вар.<br>323 | Вар.<br>363 | Вар.<br>403 |
|                   | ПММ<br>4 мкг/л              | Вар.<br>4            | Вар.<br>44  | Вар.<br>84 | Вар.<br>124 | Вар.<br>164 | Вар.<br>204 | Вар.<br>244 | Вар.<br>284 | Вар.<br>324 | Вар.<br>364 | Вар.<br>404 |
|                   | ПММ<br>5 мкг/л              | Вар.<br>5            | Вар.<br>45  | Вар.<br>85 | Вар.<br>125 | Вар.<br>165 | Вар.<br>205 | Вар.<br>245 | Вар.<br>285 | Вар.<br>325 | Вар.<br>365 | Вар.<br>405 |
|                   | ПММ<br>6 мкг/л              | Вар.<br>6            | Вар.<br>46  | Вар.<br>86 | Вар.<br>126 | Вар.<br>166 | Вар.<br>206 | Вар.<br>246 | Вар.<br>286 | Вар.<br>326 | Вар.<br>366 | Вар.<br>406 |
|                   | ПММ<br>7 мкг/л              | Вар.<br>7            | Вар.<br>47  | Вар.<br>87 | Вар.<br>127 | Вар.<br>167 | Вар.<br>207 | Вар.<br>247 | Вар.<br>287 | Вар.<br>327 | Вар.<br>367 | Вар.<br>407 |
|                   | ПММ<br>8 мкг/л              | Вар.<br>8            | Вар.<br>48  | Вар.<br>88 | Вар.<br>128 | Вар.<br>168 | Вар.<br>208 | Вар.<br>248 | Вар.<br>288 | Вар.<br>328 | Вар.<br>368 | Вар.<br>408 |
|                   | ПММ<br>9 мкг/л              | Вар.<br>9            | Вар.<br>49  | Вар.<br>89 | Вар.<br>129 | Вар.<br>169 | Вар.<br>209 | Вар.<br>249 | Вар.<br>289 | Вар.<br>329 | Вар.<br>369 | Вар.<br>409 |
|                   | ПММ<br>10 мкг/л             | Вар.<br>10           | Вар.<br>50  | Вар.<br>90 | Вар.<br>130 | Вар.<br>170 | Вар.<br>210 | Вар.<br>250 | Вар.<br>290 | Вар.<br>330 | Вар.<br>370 | Вар.<br>410 |
|                   | Приблизительно<br>1 мкг/л   | Вар.<br>11           | Вар.<br>51  | Вар.<br>91 | Вар.<br>131 | Вар.<br>171 | Вар.<br>211 | Вар.<br>251 | Вар.<br>291 | Вар.<br>331 | Вар.<br>371 | Вар.<br>411 |
|                   | Приблизительно<br>1,5 мкг/л | Вар.<br>12           | Вар.<br>52  | Вар.<br>92 | Вар.<br>132 | Вар.<br>172 | Вар.<br>212 | Вар.<br>252 | Вар.<br>292 | Вар.<br>332 | Вар.<br>372 | Вар.<br>412 |
|                   | Приблизительно<br>2 мкг/л   | Вар.<br>13           | Вар.<br>53  | Вар.<br>93 | Вар.<br>133 | Вар.<br>173 | Вар.<br>213 | Вар.<br>253 | Вар.<br>293 | Вар.<br>333 | Вар.<br>373 | Вар.<br>413 |

|                          |         |         |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
|--------------------------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Приблизительно 2,5 мкг/л | Var. 14 | Var. 54 | Var. 94  | Var. 134 | Var. 174 | Var. 214 | Var. 254 | Var. 294 | Var. 334 | Var. 374 | Var. 414 |
| Приблизительно 3 мкг/л   | Var. 15 | Var. 55 | Var. 95  | Var. 135 | Var. 175 | Var. 215 | Var. 255 | Var. 295 | Var. 335 | Var. 375 | Var. 415 |
| Приблизительно 3,5 мкг/л | Var. 16 | Var. 56 | Var. 96  | Var. 136 | Var. 176 | Var. 216 | Var. 256 | Var. 296 | Var. 336 | Var. 376 | Var. 416 |
| Приблизительно 4 мкг/л   | Var. 17 | Var. 57 | Var. 97  | Var. 137 | Var. 177 | Var. 217 | Var. 257 | Var. 297 | Var. 337 | Var. 377 | Var. 417 |
| Приблизительно 4,5 мкг/л | Var. 18 | Var. 58 | Var. 98  | Var. 138 | Var. 178 | Var. 218 | Var. 258 | Var. 298 | Var. 338 | Var. 378 | Var. 418 |
| Приблизительно 5 мкг/л   | Var. 19 | Var. 59 | Var. 99  | Var. 139 | Var. 179 | Var. 219 | Var. 259 | Var. 299 | Var. 339 | Var. 379 | Var. 419 |
| Приблизительно 5,5 мкг/л | Var. 20 | Var. 60 | Var. 100 | Var. 140 | Var. 180 | Var. 220 | Var. 260 | Var. 300 | Var. 340 | Var. 380 | Var. 420 |
| Приблизительно 6 мкг/л   | Var. 21 | Var. 61 | Var. 101 | Var. 141 | Var. 181 | Var. 221 | Var. 261 | Var. 301 | Var. 341 | Var. 381 | Var. 421 |
| Приблизительно 7 мкг/л   | Var. 22 | Var. 62 | Var. 102 | Var. 142 | Var. 182 | Var. 222 | Var. 262 | Var. 302 | Var. 342 | Var. 382 | Var. 422 |
| Приблизительно 8 мкг/л   | Var. 23 | Var. 63 | Var. 103 | Var. 143 | Var. 183 | Var. 223 | Var. 263 | Var. 303 | Var. 343 | Var. 383 | Var. 423 |
| Приблизительно 9 мкг/л   | Var. 24 | Var. 64 | Var. 104 | Var. 144 | Var. 184 | Var. 224 | Var. 264 | Var. 304 | Var. 344 | Var. 384 | Var. 424 |
| Приблизительно 10 мкг/л  | Var. 25 | Var. 65 | Var. 105 | Var. 145 | Var. 185 | Var. 225 | Var. 265 | Var. 305 | Var. 345 | Var. 385 | Var. 425 |
| 1–20 мкг/л               | Var. 26 | Var. 66 | Var. 106 | Var. 146 | Var. 186 | Var. 226 | Var. 266 | Var. 306 | Var. 346 | Var. 386 | Var. 426 |
| 2–20 мкг/л               | Var. 27 | Var. 67 | Var. 107 | Var. 147 | Var. 187 | Var. 227 | Var. 267 | Var. 307 | Var. 347 | Var. 387 | Var. 427 |
| 1–10 мкг/л               | Var. 28 | Var. 68 | Var. 108 | Var. 148 | Var. 188 | Var. 228 | Var. 268 | Var. 308 | Var. 348 | Var. 388 | Var. 428 |
| 2–10 мкг/л               | Var. 29 | Var. 69 | Var. 109 | Var. 149 | Var. 189 | Var. 229 | Var. 269 | Var. 309 | Var. 349 | Var. 389 | Var. 429 |
| 1–6 мкг/л                | Var. 30 | Var. 70 | Var. 110 | Var. 150 | Var. 190 | Var. 230 | Var. 270 | Var. 310 | Var. 350 | Var. 390 | Var. 430 |
| 2–6 мкг/л                | Var. 31 | Var. 71 | Var. 111 | Var. 151 | Var. 191 | Var. 231 | Var. 271 | Var. 311 | Var. 351 | Var. 391 | Var. 431 |
| 3–6 мкг/л                | Var. 32 | Var. 72 | Var. 112 | Var. 152 | Var. 192 | Var. 232 | Var. 272 | Var. 312 | Var. 352 | Var. 392 | Var. 432 |
| 4–6 мкг/л                | Var. 33 | Var. 73 | Var. 113 | Var. 153 | Var. 193 | Var. 233 | Var. 273 | Var. 313 | Var. 353 | Var. 393 | Var. 433 |
| 1–5 мкг/л                | Var. 34 | Var. 74 | Var. 114 | Var. 154 | Var. 194 | Var. 234 | Var. 274 | Var. 314 | Var. 354 | Var. 394 | Var. 434 |
| 2–5 мкг/л                | Var. 35 | Var. 75 | Var. 115 | Var. 155 | Var. 195 | Var. 235 | Var. 275 | Var. 315 | Var. 355 | Var. 395 | Var. 435 |
| 3–5 мкг/л                | Var. 36 | Var. 76 | Var. 116 | Var. 156 | Var. 196 | Var. 236 | Var. 276 | Var. 316 | Var. 356 | Var. 396 | Var. 436 |
| 4–5 мкг/л                | Var. 37 | Var. 77 | Var. 117 | Var. 157 | Var. 197 | Var. 237 | Var. 277 | Var. 317 | Var. 357 | Var. 397 | Var. 437 |
| 1–4 мкг/л                | Var. 38 | Var. 78 | Var. 118 | Var. 158 | Var. 198 | Var. 238 | Var. 278 | Var. 318 | Var. 358 | Var. 398 | Var. 438 |
| 2–4 мкг/л                | Var. 39 | Var. 79 | Var. 119 | Var. 159 | Var. 199 | Var. 239 | Var. 279 | Var. 319 | Var. 359 | Var. 399 | Var. 439 |
| 3–4 мкг/л                | Var. 40 | Var. 80 | Var. 120 | Var. 160 | Var. 200 | Var. 240 | Var. 280 | Var. 320 | Var. 360 | Var. 400 | Var. 440 |

\*Н.О. - не определено;

\*НБЧ - не более чем;

\*ПММ - по меньшей мере.

Согласно некоторым вариантам реализации добавление в среды меди согласно настоящему изобретению производится путем дополнения основных сред, не содержащих животных белков и/или сред с заданным химическим составом. Способы получения не содержащих животных белков и культуральных сред с заданным химическим составом известны в данной области техники, например в патентах США № 6171825 и 6936441, WO 2007/077217, и в опубликованных заявках на патент США № 2008/0009040 и 2007/0212770, раскрытия которых включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте для любых целей. Согласно одному из вариантов реализации основная культуральная среда, применяемая в способах, описанных в настоящей заявке, представляет собой не содержащую животных белков или не содержащую олигопептидов среду. Согласно определенным вариантам реализации указанная культуральная среда может быть средой с заданным химическим составом. Согласно определенным вариантам реализации указанные культуральные среды могут содержать по меньшей мере один полиамин в концентрации от приблизительно 0,5 мг/л до приблизительно 10 мг/л.

Согласно дальнейшим вариантам реализации и в дополнение к любым описанным выше согласно

настоящему изобретению предложены культуральные среды, для получения которых в основную среду добавляют медь и, по меньшей мере, что-либо одно из кальция, цинка и/или витамина В3. Согласно определенным вариантам реализации указанная среда может не содержать животных белков, не содержать олигопептидов или представлять собой среду с заданным химическим составом. Согласно определенным вариантам реализации указанная не содержащая животных белков или не содержащая олигопептидов среда получают согласно описанию в патентах США № 6171825 и 6936441, WO 2007/077217, и опубликованных заявках на патент США № 2008/0009040 и 2007/0212770, раскрытия которых включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте для любых целей; оба источника включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте для любых целей; и добавлением дополнительной меди и необязательно одного или более из кальция, цинка и витамина В3. Согласно конкретному варианту реализации культуральная среда с заданным химическим составом может быть сходной со смесью (1:1) модифицированной по Дульбекко среды Игла и среды Хэма F12 (DMEM/Хэма F12), куда добавлена дополнительная медь и необязательно кальций, цинк и/или витамин В3 для увеличения удельной активности gVWF или gA13, экспрессируемых в клетках, культивируемых в указанной среде. Согласно другим вариантам реализации указанная культуральная среда не содержит животных компонентов. Согласно другому варианту реализации указанная культуральная среда содержит белок, например, животный белок из сыворотки, такой как эмбриональная телячья сыворотка. Согласно другому варианту реализации указанная культура содержит добавленные экзогенные рекомбинантные белки. Согласно другому варианту реализации указанные белки получены от сертифицированного свободного от патогенов животного.

Согласно определенным вариантам реализации указанная культуральная среда содержит по меньшей мере один полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. Согласно другому варианту реализации указанная культуральная среда содержит по меньшей мере один полиамин в концентрации точно или приблизительно от 0,5 до 10 мг/л. Согласно одному из вариантов реализации указанная культуральная среда содержит по меньшей мере один полиамин в концентрации точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. Согласно определенным вариантам реализации указанный полиамин принадлежит группе из орнитина, путресцина, спермина или спермидина или т.п. Согласно предпочтительному варианту реализации полиамин представляет собой путресцин. Согласно конкретному варианту реализации указанная культуральная среда содержит точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л путресцина.

Согласно одному из вариантов реализации указанная культуральная среда содержит по меньшей мере один полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л, и комбинацию меди и аммония согласно любому из вариантов 1-440, приведенных в табл. 1. Согласно другому варианту реализации указанная культуральная среда содержит по меньшей мере один полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 10 мг/л, и комбинацию меди и аммония согласно любому из вариантов 1-440, приведенных в табл. 1. Согласно одному из вариантов реализации указанная культуральная среда содержит по меньшей мере один полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л, и комбинацию меди и аммония согласно любому из вариантов 1-440, приведенных в табл. 1. Согласно определенным вариантам реализации указанный полиамин входит в группу из орнитина, путресцина, спермина или спермидина, или т.п. Согласно предпочтительному варианту реализации указанный полиамин представляет собой путресцин. Согласно конкретному варианту реализации указанная культуральная среда содержит точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л путресцина и комбинацию меди и аммония согласно любому из вариантов 1-440, приведенных в табл. 1.

Согласно дальнейшим аспектам помимо меди применяемые согласно настоящему изобретению среды для клеточных культур также могут содержать что-либо одно или более из: дополнительного кальция, цинка, одного или более витамина и любых их комбинаций.

Как правило, для добавления в среды согласно настоящему изобретению может применяться любая соль кальция; неограничивающие примеры приемлемых солей включают  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaFPO}_3$ ,  $2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaI}_2$ ,  $\text{CaBr}_2$ ,  $(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2\text{Ca}$ ,  $(\text{CHO}_2)_2\text{Ca}$ ,  $(\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6)_2\text{Ca}$ ,  $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2\text{Ca}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  и т.п. Согласно определенным вариантам реализации для добавления в культуральные среды согласно настоящему изобретению применяют фармацевтически приемлемую соль кальция.

Как правило, для добавления в среды согласно изобретению может применяться любая соль цинка; неограничивающие примеры приемлемых солей включают  $\text{ZnSC}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2\text{Zn}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnBr}_2$ ,  $\text{ZnBr}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Zn}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  и т.п. Согласно определенным вариантам реализации для добавления в культуральные среды согласно настоящему изобретению применяют фармацевтически приемлемую соль цинка. Согласно другим вариантам реализации цинк-содержащий пептидный или белковый препарат, например инсулин, может применяться для добавления в описываемую в настоящей заявке культуру.

Согласно дальнейшим аспектам основные клеточные среды с добавлением меди и одного или более из описанных выше дополнительных веществ можно также применять в культурах с низкими уровнями аммония в супернатанте. Согласно определенным вариантам реализации дополненные среды для клеточных культур для применения согласно изобретения дают уровни аммония в растворе культуры клеток

менее 10 мМ. Согласно дальнейшим вариантам реализации дополненную среду для клеточных культур согласно настоящему изобретению применяют при уровнях аммония в культуре клеток, составляющих приблизительно 0,5-9,5; 1,0-9,0; 1,5-8,5; 2,0-8,0; 2,5-7,5; 3,0-7,0; 3,5-6,5; 4,0-6,0; 4,5-5,5 мМ.

Согласно одному из вариантов реализации указанные концентрации меди и аммония в среде для клеточных культур и супернатанте культуры клеток поддерживают на протяжении длительного периода времени в течение процесса производства. Согласно конкретному варианту реализации указанные концентрации меди и аммония в культуре клеток поддерживают на протяжении процесса производства, т.е. в течение времени, пока rVWF или rA13 экспрессируют и выделяют из крупномасштабной культуры клеток. Согласно определенным вариантам реализации указанные концентрации меди и аммония поддерживают в культуральном растворе на уровне согласно любому из вариантов 1-440, приведенных в табл. 1. Согласно предпочтительному варианту реализации указанные концентрации меди и аммония поддерживают в течение всего периода такого производственного процесса.

Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда, предложенная согласно настоящему изобретению, может быть представлена жидкой, сухой или порошковой формой. Указанная среда может быть предварительно разделена на аликвоты, содержащие количества, подходящие для однократного применения, либо большие количества, подходящие для более чем одной клеточной культуры. Как правило, среда согласно настоящему изобретению представлена в стерильном виде.

Ниже обсуждаются характерные особенности сред для клеточных культур, подходящих для получения rVWF или rA13. Несмотря на то что они описаны применительно либо к rVWF, либо к rA13, необходимо понимать, что любые приведенные ниже описания, относящиеся к rVWF, подходят и для rA13, и наоборот.

А. Среды для клеточных культур для получения рекомбинантного VWF.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к раствору культуры клеток для получения рекомбинантных vWF, более конкретно - высокомолекулярных vWF, обладающих высокой удельной активностью, которые описаны ниже в настоящей заявке. Согласно одному из вариантов реализации настоящее изобретение предлагает раствор культуры клеток для получения высокомолекулярного рекомбинантного vWF, содержащий среду для клеточной культуры, содержащую медь в концентрации по меньшей мере приблизительно 2,4 мкг/л, и множество клеток, экспрессирующих высокомультимерные vWF, содержащие от приблизительно 14 до приблизительно 22 димеров и обладающие удельной ристотин-кофакторной активностью, составляющей по меньшей мере приблизительно 30 мЕ/мкг.

Согласно одному из вариантов реализации раствор культуры клеток также содержит аммоний в концентрации менее чем 10 мМ. Согласно предпочтительному варианту реализации указанная культура клеток содержит аммоний в концентрации не выше 5 мМ. Согласно другим вариантам реализации указанная культура клеток содержит аммоний в концентрации не выше 10 мМ, или не выше 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 мМ или менее. Согласно другим вариантам реализации указанная культура клеток содержит концентрацию меди и аммония согласно любому из вариантов 1-440, приведенных в табл. 1. Согласно определенным вариантам реализации концентрацию аммония в культуре клеток поддерживают в течение длительного периода на уровне концентрации согласно описанию выше. Например, согласно одному из вариантов реализации концентрацию аммония поддерживают на низком уровне в течение по меньшей мере 3 дней или по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 или более дней. Согласно конкретному варианту реализации концентрацию аммония в культуре клеток поддерживают на уровне не выше 5 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно другому конкретному варианту реализации концентрацию аммония в культуре клеток поддерживают на уровне не выше 4 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно конкретному варианту реализации концентрацию аммония в культуре клеток поддерживают на уровне не выше 5 мМ в течение по меньшей мере 14 дней. Согласно другому конкретному варианту реализации концентрацию аммония в культуре клеток поддерживают на уровне не выше 4 мМ в течение по меньшей мере 14 дней. Согласно еще одному из вариантов реализации концентрацию аммония в культуре клеток поддерживают на низком уровне на протяжении процесса (т.е. в течение всего времени, на протяжении которого указанная культура используется для получения rVWF).

Согласно одному из вариантов реализации настоящего изобретения среды для клеточных культур могут содержать медь в концентрации по меньшей мере приблизительно 2,4 мкг/л, согласно другому варианту реализации - по меньшей мере приблизительно 3 мкг/л, согласно еще одному варианту реализации - по меньшей мере приблизительно 4 мкг/л, согласно еще одному варианту реализации - по меньшей мере приблизительно 8 мкг/л, согласно еще одному варианту реализации - по меньшей мере приблизительно 10 мкг/л, согласно еще одному варианту реализации - по меньшей мере приблизительно 15 мкг/л и согласно дальнейшему варианту реализации - по меньшей мере приблизительно 20 мкг/л.

Согласно другим вариантам реализации концентрация меди в среде для клеточных культур согласно настоящему изобретению может варьировать от приблизительно 2,4 мкг/л до приблизительно 20 мкг/л, согласно другому варианту реализации - от приблизительно 2,4 мкг/л до приблизительно 15 мкг/л, согласно еще одному варианту реализации - от приблизительно 2,4 мкг/л до приблизительно 10 мкг/л, согласно еще одному варианту реализации - от приблизительно 2,4 мкг/л до приблизительно 8 мкг/л,

согласно еще одному варианту реализации - от приблизительно 2,4 мкг/л до приблизительно 6 мкг/л, согласно еще одному варианту реализации - от приблизительно 2,4 мкг/л до приблизительно 4 мкг/л, согласно еще одному варианту реализации - от приблизительно 4 мкг/л до приблизительно 20 мкг/л, согласно еще одному варианту реализации - от приблизительно 4 мкг/л до приблизительно 15 мкг/л, согласно еще одному варианту реализации - от приблизительно 4 мкг/л до приблизительно 10 мкг/л, согласно еще одному варианту реализации - от приблизительно 4 мкг/л до приблизительно 8 мкг/л, и согласно дальнейшему варианту реализации - от приблизительно 4 мкг/л до приблизительно 6 мкг г/л.

Согласно настоящему изобретению также предложены наборы для экспрессии или получения rVWF; указанные наборы содержат культуральную среду, подходящую для экспрессии rVWF, обладающего высокой удельной активностью.

В. Среды для клеточных культур для получения ADAMTS13 (A13).

Согласно одному из аспектов настоящее изобретение предлагает культуральные среды, подходящие для экспрессии белков ADAMTS, обладающих высокой удельной активностью. Удачным образом, было обнаружено, что добавление в культуральную среду меди значительно повышает активность рекомбинантных ферментов ADAMTS (например, rADAMTS13), экспрессируемых в клетках, культивируемых в указанной дополненной среде, в то время как указанные ферменты экспрессируются на уровнях, равных или превышающих таковые для клеток, культивируемых в среде без добавок.

Согласно одному из аспектов настоящее изобретение предлагает среды для клеточных культур с добавлением меди для экспрессии рекомбинантного белка ADAMTS13 с высокой удельной активностью. Согласно одному из вариантов реализации указанные среды дополняют до получения общей концентрации меди, составляющей от приблизительно 2 до приблизительно 4 мкг/л. Согласно дальнейшим вариантам реализации указанные среды дополняют до получения общей концентрации меди приблизительно 1-3, 2-3, 3-4 мкг/л. Согласно одному из вариантов реализации указанные среды содержат медь в концентрации по меньшей мере 1 мкг/л. Согласно другому варианту реализации указанная среда содержит по меньшей мере 2 мкг/л меди. Согласно другому варианту реализации указанная среда содержит по меньшей мере 4 мкг/л меди. Согласно другим вариантам реализации указанная среда содержит от 2 до 20 мкг/л меди. Согласно другому варианту реализации указанная среда содержит от 1 до 6 мкг/л меди. Согласно другому варианту реализации указанная среда содержит от 2 до 5 мкг/л меди. Согласно другому варианту реализации указанная среда содержит от 3 до 4 мкг/л меди. Согласно другим вариантам реализации указанная среда содержит по меньшей мере 1 мкг/л меди, или по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 мкг/л, либо более высокие концентрации меди.

Согласно одному из вариантов реализации раствор культуры клеток также содержит аммоний в концентрации менее чем 10 мМ. Согласно предпочтительному варианту реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации не выше 5 мМ. Согласно другим вариантам реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации не выше 10 мМ или не выше 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 мМ или менее. Согласно другим вариантам реализации раствор культуры клеток содержит концентрацию меди и аммония согласно любому из вариантов 1-440, приведенных в табл. 1. Согласно определенным вариантам реализации концентрацию аммония в культуре клеток поддерживают в течение длительного периода на уровне концентрации согласно приведенному выше описанию. Например, согласно одному из вариантов реализации концентрацию аммония поддерживают на низком уровне в течение по меньшей мере 3 дней, или по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 или более дней. Согласно конкретному варианту реализации концентрацию аммония в культуре клеток поддерживают на уровне не выше 5 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно другому конкретному варианту реализации концентрацию аммония в культуре клеток поддерживают на уровне не выше 4 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно конкретному варианту реализации концентрацию аммония в культуре клеток поддерживают на уровне не выше 5 мМ в течение по меньшей мере 14 дней. Согласно другому конкретному варианту реализации концентрацию аммония в культуре клеток поддерживают на уровне не выше 4 мМ в течение по меньшей мере 14 дней. Согласно еще одному из вариантов реализации концентрацию аммония в культуре клеток поддерживают на низком уровне на протяжении процесса (т.е. в течение всего времени, на протяжении которого указанная культура используется для получения rA13).

Согласно одному из вариантов реализации получают культуральную среду для экспрессии рекомбинантного белка ADAMTS (например, rADAMTS13), содержащую по меньшей мере 1 мкг/л меди и по меньшей мере 2 мкМ цинка. Согласно другим вариантам реализации указанная среда содержит по меньшей мере 2 мкг/л меди или по меньшей мере 4 мкг/л меди. Согласно другому варианту реализации, когда в среды добавляют медь, указанная культуральная среда также содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка. Согласно одному из вариантов реализации указанная культуральная среда также содержит точно или приблизительно от 2 до 12 мкМ цинка. Согласно другому варианту реализации указанная культуральная среда также содержит точно или приблизительно от 5 до 12 мкМ цинка. Согласно другим вариантам реализации указанная культуральная среда также может содержать по меньшей мере точно или приблизительно 2 мкМ или по меньшей мере точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или более цинка. Согласно одному из вариантов реализации

указанная культуральная среда содержит медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных в табл. 2.

Таблица 2. Типовые варианты реализации концентраций меди и цинка в культуральных средах, подходящих для экспрессии рекомбинантного белка ADAMTS13

|                   |                             | Концентрация цинка |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                  |             |             |
|-------------------|-----------------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-------------|-------------|
|                   |                             | ПММ<br>2<br>мкМ    | ПММ<br>3<br>мкМ | ПММ<br>4<br>мкМ | ПММ<br>5<br>мкМ | ПММ<br>6<br>мкМ | ПММ<br>7<br>мкМ | ПММ<br>8<br>мкМ | ПММ<br>9<br>мкМ | ПММ<br>10<br>мкМ | 2–12<br>мкМ | 5–12<br>мкМ |
| Концентрация меди | ПММ<br>1 мкг/л              | Вар.<br>441        | Вар.<br>481     | Вар.<br>521     | Вар.<br>561     | Вар.<br>601     | Вар.<br>641     | Вар.<br>681     | Вар.<br>721     | Вар.<br>761      | Вар.<br>801 | Вар.<br>841 |
|                   | ПММ<br>2 мкг/л              | Вар.<br>442        | Вар.<br>482     | Вар.<br>522     | Вар.<br>562     | Вар.<br>602     | Вар.<br>642     | Вар.<br>682     | Вар.<br>722     | Вар.<br>762      | Вар.<br>802 | Вар.<br>842 |
|                   | ПММ<br>3 мкг/л              | Вар.<br>443        | Вар.<br>483     | Вар.<br>523     | Вар.<br>563     | Вар.<br>603     | Вар.<br>643     | Вар.<br>683     | Вар.<br>723     | Вар.<br>763      | Вар.<br>803 | Вар.<br>843 |
|                   | ПММ<br>4 мкг/л              | Вар.<br>444        | Вар.<br>484     | Вар.<br>524     | Вар.<br>564     | Вар.<br>604     | Вар.<br>644     | Вар.<br>684     | Вар.<br>724     | Вар.<br>764      | Вар.<br>804 | Вар.<br>844 |
|                   | ПММ<br>5 мкг/л              | Вар.<br>445        | Вар.<br>485     | Вар.<br>525     | Вар.<br>565     | Вар.<br>605     | Вар.<br>645     | Вар.<br>685     | Вар.<br>725     | Вар.<br>765      | Вар.<br>805 | Вар.<br>845 |
|                   | ПММ<br>6 мкг/л              | Вар.<br>446        | Вар.<br>486     | Вар.<br>526     | Вар.<br>566     | Вар.<br>606     | Вар.<br>646     | Вар.<br>686     | Вар.<br>726     | Вар.<br>766      | Вар.<br>806 | Вар.<br>846 |
|                   | ПММ<br>7 мкг/л              | Вар.<br>447        | Вар.<br>487     | Вар.<br>527     | Вар.<br>567     | Вар.<br>607     | Вар.<br>647     | Вар.<br>687     | Вар.<br>727     | Вар.<br>767      | Вар.<br>807 | Вар.<br>847 |
|                   | ПММ<br>8 мкг/л              | Вар.<br>448        | Вар.<br>488     | Вар.<br>528     | Вар.<br>568     | Вар.<br>608     | Вар.<br>648     | Вар.<br>688     | Вар.<br>728     | Вар.<br>768      | Вар.<br>808 | Вар.<br>848 |
|                   | ПММ<br>9 мкг/л              | Вар.<br>449        | Вар.<br>489     | Вар.<br>529     | Вар.<br>569     | Вар.<br>609     | Вар.<br>649     | Вар.<br>689     | Вар.<br>729     | Вар.<br>769      | Вар.<br>809 | Вар.<br>849 |
|                   | ПММ<br>10 мкг/л             | Вар.<br>450        | Вар.<br>490     | Вар.<br>530     | Вар.<br>570     | Вар.<br>610     | Вар.<br>650     | Вар.<br>690     | Вар.<br>730     | Вар.<br>770      | Вар.<br>810 | Вар.<br>850 |
|                   | Приблизительно<br>1 мкг/л   | Вар.<br>451        | Вар.<br>491     | Вар.<br>531     | Вар.<br>571     | Вар.<br>611     | Вар.<br>651     | Вар.<br>691     | Вар.<br>731     | Вар.<br>771      | Вар.<br>811 | Вар.<br>851 |
|                   | Приблизительно<br>1.5 мкг/л | Вар.<br>452        | Вар.<br>492     | Вар.<br>532     | Вар.<br>572     | Вар.<br>612     | Вар.<br>652     | Вар.<br>692     | Вар.<br>732     | Вар.<br>772      | Вар.<br>812 | Вар.<br>852 |
|                   | Приблизительно<br>2 мкг/л   | Вар.<br>453        | Вар.<br>493     | Вар.<br>533     | Вар.<br>573     | Вар.<br>613     | Вар.<br>653     | Вар.<br>693     | Вар.<br>733     | Вар.<br>773      | Вар.<br>813 | Вар.<br>853 |
|                   | Приблизительно<br>2.5 мкг/л | Вар.<br>454        | Вар.<br>494     | Вар.<br>534     | Вар.<br>574     | Вар.<br>614     | Вар.<br>654     | Вар.<br>694     | Вар.<br>734     | Вар.<br>774      | Вар.<br>814 | Вар.<br>854 |
|                   | Приблизительно<br>3 мкг/л   | Вар.<br>455        | Вар.<br>495     | Вар.<br>535     | Вар.<br>575     | Вар.<br>615     | Вар.<br>655     | Вар.<br>695     | Вар.<br>735     | Вар.<br>775      | Вар.<br>815 | Вар.<br>855 |
|                   | Приблизительно<br>3.5 мкг/л | Вар.<br>456        | Вар.<br>496     | Вар.<br>536     | Вар.<br>576     | Вар.<br>616     | Вар.<br>656     | Вар.<br>696     | Вар.<br>736     | Вар.<br>776      | Вар.<br>816 | Вар.<br>856 |

|                          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
|--------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Приблизительно 4 мкг/л   | Вар. 457 | Вар. 497 | Вар. 537 | Вар. 577 | Вар. 617 | Вар. 657 | Вар. 697 | Вар. 737 | Вар. 777 | Вар. 817 | Вар. 857 |
| Приблизительно 4.5 мкг/л | Вар. 458 | Вар. 498 | Вар. 538 | Вар. 578 | Вар. 618 | Вар. 658 | Вар. 698 | Вар. 738 | Вар. 778 | Вар. 818 | Вар. 858 |
| Приблизительно 5 мкг/л   | Вар. 459 | Вар. 499 | Вар. 539 | Вар. 579 | Вар. 619 | Вар. 659 | Вар. 699 | Вар. 739 | Вар. 779 | Вар. 819 | Вар. 859 |
| Приблизительно 5.5 мкг/л | Вар. 460 | Вар. 500 | Вар. 540 | Вар. 580 | Вар. 620 | Вар. 660 | Вар. 700 | Вар. 740 | Вар. 780 | Вар. 820 | Вар. 860 |
| Приблизительно 6 мкг/л   | Вар. 461 | Вар. 501 | Вар. 541 | Вар. 581 | Вар. 621 | Вар. 661 | Вар. 701 | Вар. 741 | Вар. 781 | Вар. 821 | Вар. 861 |
| Приблизительно 7 мкг/л   | Вар. 462 | Вар. 502 | Вар. 542 | Вар. 582 | Вар. 622 | Вар. 662 | Вар. 702 | Вар. 742 | Вар. 782 | Вар. 822 | Вар. 862 |
| Приблизительно 8 мкг/л   | Вар. 463 | Вар. 503 | Вар. 543 | Вар. 583 | Вар. 623 | Вар. 663 | Вар. 703 | Вар. 743 | Вар. 783 | Вар. 823 | Вар. 863 |
| Приблизительно 9 мкг/л   | Вар. 464 | Вар. 504 | Вар. 544 | Вар. 584 | Вар. 624 | Вар. 664 | Вар. 704 | Вар. 744 | Вар. 784 | Вар. 824 | Вар. 864 |
| Приблизительно 10 мкг/л  | Вар. 465 | Вар. 505 | Вар. 545 | Вар. 585 | Вар. 625 | Вар. 665 | Вар. 705 | Вар. 745 | Вар. 785 | Вар. 825 | Вар. 865 |
| 1–20 мкг/л               | Вар. 466 | Вар. 506 | Вар. 546 | Вар. 586 | Вар. 626 | Вар. 666 | Вар. 706 | Вар. 746 | Вар. 786 | Вар. 826 | Вар. 866 |
| 2–20 мкг/л               | Вар. 467 | Вар. 507 | Вар. 547 | Вар. 587 | Вар. 627 | Вар. 667 | Вар. 707 | Вар. 747 | Вар. 787 | Вар. 827 | Вар. 867 |
| 1–10 мкг/л               | Вар. 468 | Вар. 508 | Вар. 548 | Вар. 588 | Вар. 628 | Вар. 668 | Вар. 708 | Вар. 748 | Вар. 788 | Вар. 828 | Вар. 868 |
| 2–10 мкг/л               | Вар. 469 | Вар. 509 | Вар. 549 | Вар. 589 | Вар. 629 | Вар. 669 | Вар. 709 | Вар. 749 | Вар. 789 | Вар. 829 | Вар. 869 |
| 1–6 мкг/л                | Вар. 470 | Вар. 510 | Вар. 550 | Вар. 590 | Вар. 630 | Вар. 670 | Вар. 710 | Вар. 750 | Вар. 790 | Вар. 830 | Вар. 870 |
| 2–6 мкг/л                | Вар. 471 | Вар. 511 | Вар. 551 | Вар. 591 | Вар. 631 | Вар. 671 | Вар. 711 | Вар. 751 | Вар. 791 | Вар. 831 | Вар. 871 |
| 3–6 мкг/л                | Вар. 472 | Вар. 512 | Вар. 552 | Вар. 592 | Вар. 632 | Вар. 672 | Вар. 712 | Вар. 752 | Вар. 792 | Вар. 832 | Вар. 872 |
| 4–6 мкг/л                | Вар. 473 | Вар. 513 | Вар. 553 | Вар. 593 | Вар. 633 | Вар. 673 | Вар. 713 | Вар. 753 | Вар. 793 | Вар. 833 | Вар. 873 |
| 1–5 мкг/л                | Вар. 474 | Вар. 514 | Вар. 554 | Вар. 594 | Вар. 634 | Вар. 674 | Вар. 714 | Вар. 754 | Вар. 794 | Вар. 834 | Вар. 874 |
| 2–5 мкг/л                | Вар. 475 | Вар. 515 | Вар. 555 | Вар. 595 | Вар. 635 | Вар. 675 | Вар. 715 | Вар. 755 | Вар. 795 | Вар. 835 | Вар. 875 |
| 3–5 мкг/л                | Вар. 476 | Вар. 516 | Вар. 556 | Вар. 596 | Вар. 636 | Вар. 676 | Вар. 716 | Вар. 756 | Вар. 796 | Вар. 836 | Вар. 876 |
| 4–5 мкг/л                | Вар. 477 | Вар. 517 | Вар. 557 | Вар. 597 | Вар. 637 | Вар. 677 | Вар. 717 | Вар. 757 | Вар. 797 | Вар. 837 | Вар. 877 |
| 1–4 мкг/л                | Вар. 478 | Вар. 518 | Вар. 558 | Вар. 598 | Вар. 638 | Вар. 678 | Вар. 718 | Вар. 758 | Вар. 798 | Вар. 838 | Вар. 878 |
| 2–4 мкг/л                | Вар. 479 | Вар. 519 | Вар. 559 | Вар. 599 | Вар. 639 | Вар. 679 | Вар. 719 | Вар. 759 | Вар. 799 | Вар. 839 | Вар. 879 |
| 3–4 мкг/л                | Вар. 480 | Вар. 520 | Вар. 560 | Вар. 600 | Вар. 640 | Вар. 680 | Вар. 720 | Вар. 760 | Вар. 800 | Вар. 840 | Вар. 880 |

\*ПММ - по меньшей мере.

Согласно одному из вариантов реализации раствор культуры клеток также содержит низкую концентрацию аммония. Согласно одному из вариантов реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации менее чем 10 мМ, и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных в табл. 2. Согласно конкретному варианту реализации концентрацию аммония поддерживают на уровне не выше 10 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно предпочтительному варианту реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации не выше 6 мМ и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных в табл. 2. Согласно конкретному варианту реализации концентрацию аммония поддерживают на уровне не выше 6 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно другому предпочтительному варианту реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации не выше 5 мМ и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных в табл. 2. Согласно конкретному варианту реализации концентрацию аммония поддерживают на уровне не выше 5 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно другому предпочтительному варианту реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации не выше 4 мМ и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных в табл. 2. Согласно конкретному варианту реализации концентрацию аммония поддерживают на уровне не выше 4 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно другим вариантам реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации не выше 10 мМ или не выше 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 мМ или менее и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приве-

денных в табл. 2. Согласно еще одному конкретному варианту реализации концентрацию аммония в культуре клеток поддерживают на низком уровне на протяжении процесса (т.е. в течение всего времени, на протяжении которого указанная культура используется для получения гА13).

Согласно одному из вариантов реализации получают культуральную среду для экспрессии рекомбинантного белка ADAMTS (например, гADAMTS13), содержащую по меньшей мере 1 мкг/л меди и по меньшей мере точно или приблизительно 0,5 мМ кальция. Согласно другим вариантам реализации указанная среда содержит по меньшей мере 2 мкг/л меди или по меньшей мере 4 мкг/л меди. Согласно другому варианту реализации, когда в среды добавляют медь, указанная культуральная среда также содержит по меньшей мере 1,5 мМ кальция. Согласно одному из вариантов реализации указанная культуральная среда содержит точно или приблизительно от 0,5 до 1,5 мМ кальция. Согласно другим вариантам реализации указанная культуральная среда может содержать по меньшей мере точно или приблизительно 0,5 мМ, или по меньшей мере точно или приблизительно 0,6 мМ; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8; 1,9; 2,0; 2,25; 2,5; 2,75; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 мМ, или более, кальция. Согласно одному из вариантов реализации указанная культуральная среда содержит медь и кальция в концентрации согласно любому из вариантов 881-1320, приведенных в табл. 3.

Таблица 3. Типовые варианты реализации концентраций меди и кальция в культуральных средах, подходящих для экспрессии рекомбинантного белка ADAMTS13

|                   |                             | Концентрация кальция |                   |                  |                   |                  |                  |                  |                  |              |              |                   |
|-------------------|-----------------------------|----------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|--------------|--------------|-------------------|
|                   |                             | ПММ<br>0,5<br>мМ     | ПММ<br>0,75<br>мМ | ПММ<br>1,0<br>мМ | ПММ<br>1,25<br>мМ | ПММ<br>1,5<br>мМ | ПММ<br>2,0<br>мМ | ПММ<br>2,5<br>мМ | ПММ<br>3,0<br>мМ | ПММ<br>4 мМ  | ПММ<br>5 мМ  | 0,5–<br>1,5<br>мМ |
| Концентрация меди | ПММ<br>1 мкг/л              | Вар.<br>881          | Вар.<br>921       | Вар.<br>961      | Вар.<br>1001      | Вар.<br>1041     | Вар.<br>1081     | Вар.<br>1121     | Вар.<br>1161     | Вар.<br>1201 | Вар.<br>1241 | Вар.<br>1281      |
|                   | ПММ<br>2 мкг/л              | Вар.<br>882          | Вар.<br>922       | Вар.<br>962      | Вар.<br>1002      | Вар.<br>1042     | Вар.<br>1082     | Вар.<br>1122     | Вар.<br>1162     | Вар.<br>1202 | Вар.<br>1242 | Вар.<br>1282      |
|                   | ПММ<br>3 мкг/л              | Вар.<br>883          | Вар.<br>923       | Вар.<br>963      | Вар.<br>1003      | Вар.<br>1043     | Вар.<br>1083     | Вар.<br>1123     | Вар.<br>1163     | Вар.<br>1203 | Вар.<br>1243 | Вар.<br>1283      |
|                   | ПММ<br>4 мкг/л              | Вар.<br>884          | Вар.<br>924       | Вар.<br>964      | Вар.<br>1004      | Вар.<br>1044     | Вар.<br>1084     | Вар.<br>1124     | Вар.<br>1164     | Вар.<br>1204 | Вар.<br>1244 | Вар.<br>1284      |
|                   | ПММ<br>5 мкг/л              | Вар.<br>885          | Вар.<br>925       | Вар.<br>965      | Вар.<br>1005      | Вар.<br>1045     | Вар.<br>1085     | Вар.<br>1125     | Вар.<br>1165     | Вар.<br>1205 | Вар.<br>1245 | Вар.<br>1285      |
|                   | ПММ<br>6 мкг/л              | Вар.<br>886          | Вар.<br>926       | Вар.<br>966      | Вар.<br>1006      | Вар.<br>1046     | Вар.<br>1086     | Вар.<br>1126     | Вар.<br>1166     | Вар.<br>1206 | Вар.<br>1246 | Вар.<br>1286      |
|                   | ПММ<br>7 мкг/л              | Вар.<br>887          | Вар.<br>927       | Вар.<br>967      | Вар.<br>1007      | Вар.<br>1047     | Вар.<br>1087     | Вар.<br>1127     | Вар.<br>1167     | Вар.<br>1207 | Вар.<br>1247 | Вар.<br>1287      |
|                   | ПММ<br>8 мкг/л              | Вар.<br>888          | Вар.<br>928       | Вар.<br>968      | Вар.<br>1008      | Вар.<br>1048     | Вар.<br>1088     | Вар.<br>1128     | Вар.<br>1168     | Вар.<br>1208 | Вар.<br>1248 | Вар.<br>1288      |
|                   | ПММ<br>9 мкг/л              | Вар.<br>889          | Вар.<br>929       | Вар.<br>969      | Вар.<br>1009      | Вар.<br>1049     | Вар.<br>1089     | Вар.<br>1129     | Вар.<br>1169     | Вар.<br>1209 | Вар.<br>1249 | Вар.<br>1289      |
|                   | ПММ<br>10 мкг/л             | Вар.<br>890          | Вар.<br>930       | Вар.<br>970      | Вар.<br>1010      | Вар.<br>1050     | Вар.<br>1090     | Вар.<br>1130     | Вар.<br>1170     | Вар.<br>1210 | Вар.<br>1250 | Вар.<br>1290      |
|                   | Приблизительно<br>1 мкг/л   | Вар.<br>891          | Вар.<br>931       | Вар.<br>971      | Вар.<br>1011      | Вар.<br>1051     | Вар.<br>1091     | Вар.<br>1131     | Вар.<br>1171     | Вар.<br>1211 | Вар.<br>1251 | Вар.<br>1291      |
|                   | Приблизительно<br>1,5 мкг/л | Вар.<br>892          | Вар.<br>932       | Вар.<br>972      | Вар.<br>1012      | Вар.<br>1052     | Вар.<br>1092     | Вар.<br>1132     | Вар.<br>1172     | Вар.<br>1212 | Вар.<br>1252 | Вар.<br>1292      |
|                   | Приблизительно<br>2 мкг/л   | Вар.<br>893          | Вар.<br>933       | Вар.<br>973      | Вар.<br>1013      | Вар.<br>1053     | Вар.<br>1093     | Вар.<br>1133     | Вар.<br>1173     | Вар.<br>1213 | Вар.<br>1253 | Вар.<br>1293      |
|                   | Приблизительно<br>2,5 мкг/л | Вар.<br>894          | Вар.<br>934       | Вар.<br>974      | Вар.<br>1014      | Вар.<br>1054     | Вар.<br>1094     | Вар.<br>1134     | Вар.<br>1174     | Вар.<br>1214 | Вар.<br>1254 | Вар.<br>1294      |
|                   | Приблизительно<br>3 мкг/л   | Вар.<br>895          | Вар.<br>935       | Вар.<br>975      | Вар.<br>1015      | Вар.<br>1055     | Вар.<br>1095     | Вар.<br>1135     | Вар.<br>1175     | Вар.<br>1215 | Вар.<br>1255 | Вар.<br>1295      |
|                   | Приблизительно<br>3,5 мкг/л | Вар.<br>896          | Вар.<br>936       | Вар.<br>976      | Вар.<br>1016      | Вар.<br>1056     | Вар.<br>1096     | Вар.<br>1136     | Вар.<br>1176     | Вар.<br>1216 | Вар.<br>1256 | Вар.<br>1296      |

|                          |          |          |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|--------------------------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Приблизительно 4 мкг/л   | Var. 897 | Var. 937 | Var. 977  | Var. 1017 | Var. 1057 | Var. 1097 | Var. 1137 | Var. 1177 | Var. 1217 | Var. 1257 | Var. 1297 |
| Приблизительно 4,5 мкг/л | Var. 898 | Var. 938 | Var. 978  | Var. 1018 | Var. 1058 | Var. 1098 | Var. 1138 | Var. 1178 | Var. 1218 | Var. 1258 | Var. 1298 |
| Приблизительно 5 мкг/л   | Var. 899 | Var. 939 | Var. 979  | Var. 1019 | Var. 1059 | Var. 1099 | Var. 1139 | Var. 1179 | Var. 1219 | Var. 1259 | Var. 1299 |
| Приблизительно 5,5 мкг/л | Var. 900 | Var. 940 | Var. 980  | Var. 1020 | Var. 1060 | Var. 1100 | Var. 1140 | Var. 1180 | Var. 1220 | Var. 1260 | Var. 1300 |
| Приблизительно 6 мкг/л   | Var. 901 | Var. 941 | Var. 981  | Var. 1021 | Var. 1061 | Var. 1101 | Var. 1141 | Var. 1181 | Var. 1221 | Var. 1261 | Var. 1301 |
| Приблизительно 7 мкг/л   | Var. 902 | Var. 942 | Var. 982  | Var. 1022 | Var. 1062 | Var. 1102 | Var. 1142 | Var. 1182 | Var. 1222 | Var. 1262 | Var. 1302 |
| Приблизительно 8 мкг/л   | Var. 903 | Var. 943 | Var. 983  | Var. 1023 | Var. 1063 | Var. 1103 | Var. 1143 | Var. 1183 | Var. 1223 | Var. 1263 | Var. 1303 |
| Приблизительно 9 мкг/л   | Var. 904 | Var. 944 | Var. 984  | Var. 1024 | Var. 1064 | Var. 1104 | Var. 1144 | Var. 1184 | Var. 1224 | Var. 1264 | Var. 1304 |
| Приблизительно 10 мкг/л  | Var. 905 | Var. 945 | Var. 985  | Var. 1025 | Var. 1065 | Var. 1105 | Var. 1145 | Var. 1185 | Var. 1225 | Var. 1265 | Var. 1305 |
| 1–20 мкг/л               | Var. 906 | Var. 946 | Var. 986  | Var. 1026 | Var. 1066 | Var. 1106 | Var. 1146 | Var. 1186 | Var. 1226 | Var. 1266 | Var. 1306 |
| 2–20 мкг/л               | Var. 907 | Var. 947 | Var. 987  | Var. 1027 | Var. 1067 | Var. 1107 | Var. 1147 | Var. 1187 | Var. 1227 | Var. 1267 | Var. 1307 |
| 1–10 мкг/л               | Var. 908 | Var. 948 | Var. 988  | Var. 1028 | Var. 1068 | Var. 1108 | Var. 1148 | Var. 1188 | Var. 1228 | Var. 1268 | Var. 1308 |
| 2–10 мкг/л               | Var. 909 | Var. 949 | Var. 989  | Var. 1029 | Var. 1069 | Var. 1109 | Var. 1149 | Var. 1189 | Var. 1229 | Var. 1269 | Var. 1309 |
| 1–6 мкг/л                | Var. 910 | Var. 950 | Var. 990  | Var. 1030 | Var. 1070 | Var. 1110 | Var. 1150 | Var. 1190 | Var. 1230 | Var. 1270 | Var. 1310 |
| 2–6 мкг/л                | Var. 911 | Var. 951 | Var. 991  | Var. 1031 | Var. 1071 | Var. 1111 | Var. 1151 | Var. 1191 | Var. 1231 | Var. 1271 | Var. 1311 |
| 3–6 мкг/л                | Var. 912 | Var. 952 | Var. 992  | Var. 1032 | Var. 1072 | Var. 1112 | Var. 1152 | Var. 1192 | Var. 1232 | Var. 1272 | Var. 1312 |
| 4–6 мкг/л                | Var. 913 | Var. 953 | Var. 993  | Var. 1033 | Var. 1073 | Var. 1113 | Var. 1153 | Var. 1193 | Var. 1233 | Var. 1273 | Var. 1313 |
| 1–5 мкг/л                | Var. 914 | Var. 954 | Var. 994  | Var. 1034 | Var. 1074 | Var. 1114 | Var. 1154 | Var. 1194 | Var. 1234 | Var. 1274 | Var. 1314 |
| 2–5 мкг/л                | Var. 915 | Var. 955 | Var. 995  | Var. 1035 | Var. 1075 | Var. 1115 | Var. 1155 | Var. 1195 | Var. 1235 | Var. 1275 | Var. 1315 |
| 3–5 мкг/л                | Var. 916 | Var. 956 | Var. 996  | Var. 1036 | Var. 1076 | Var. 1116 | Var. 1156 | Var. 1196 | Var. 1236 | Var. 1276 | Var. 1316 |
| 4–5 мкг/л                | Var. 917 | Var. 957 | Var. 997  | Var. 1037 | Var. 1077 | Var. 1117 | Var. 1157 | Var. 1197 | Var. 1237 | Var. 1277 | Var. 1317 |
| 1–4 мкг/л                | Var. 918 | Var. 958 | Var. 998  | Var. 1038 | Var. 1078 | Var. 1118 | Var. 1158 | Var. 1198 | Var. 1238 | Var. 1278 | Var. 1318 |
| 2–4 мкг/л                | Var. 919 | Var. 959 | Var. 999  | Var. 1039 | Var. 1079 | Var. 1119 | Var. 1159 | Var. 1199 | Var. 1239 | Var. 1279 | Var. 1319 |
| 3–4 мкг/л                | Var. 920 | Var. 960 | Var. 1000 | Var. 1040 | Var. 1080 | Var. 1120 | Var. 1160 | Var. 1200 | Var. 1240 | Var. 1280 | Var. 1320 |

\*ПММ - по меньшей мере.

Согласно одному из вариантов реализации раствор культуры клеток также содержит низкую концентрацию аммония. Согласно одному из вариантов реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации менее чем 10 мМ и медь и кальций в концентрациях согласно любому из вариантов 881-1320, приведенных в табл. 3. Согласно конкретному варианту реализации концентрацию аммония поддерживают на уровне, не превышающем 10 мМ, в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно предпочтительному варианту реализации указанная среда для клеточной культуры содержит аммоний в концентрации не выше 6 мМ и медь и кальций в концентрациях согласно любому из вариантов 881-1320, приведенных в табл. 3. Согласно конкретному варианту реализации концентрацию аммония поддерживают на уровне не выше 6 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно другому предпочтительному варианту реализации указанная среда для клеточной культуры содержит аммоний в концентрации не выше 5 мМ и медь и кальций в концентрациях согласно любому из вариантов 881-1320, приведенных в табл. 3. Согласно конкретному варианту реализации концентрацию аммония поддерживают на уровне не выше 5 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно другому предпочтительному варианту реализации указанная среда для клеточной культуры содержит аммоний в концентрации не выше 4 мМ и медь и кальций в концентрациях согласно любому из вариантов 881-1320, приведенных в табл. 3. Согласно конкретному варианту реализации концентрацию аммония поддерживают на уровне не выше 4 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно другим вариантам реализации указанная среда для клеточной культуры содержит аммоний в концентрации не выше 10 мМ или не выше 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 мМ или

менее и медь и кальций в концентрациях согласно любому из вариантов 881-1320, приведенных в табл. 3. Согласно еще одному конкретному варианту реализации концентрацию аммония в культуре клеток поддерживают на низком уровне на протяжении процесса (т.е. в течение всего времени, на протяжении которого указанная культура используется для получения гА13).

Согласно одному из вариантов реализации в среду для клеточной культуры добавляют медь, цинк и кальций. Согласно конкретному варианту реализации культуральная среда содержит кальций в концентрации по меньшей мере 0,5 мМ и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных в табл. 2. Согласно другому конкретному варианту реализации культуральная среда содержит кальций в концентрации по меньшей мере 1,5 мМ и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных в табл. 2. Согласно другому конкретному варианту реализации указанная культуральная среда содержит кальций в концентрации от 0,5 и 1,5 мМ и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных в табл. 2. Согласно другим вариантам реализации культуральная среда содержит кальций в концентрации по меньшей мере 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8; 1,9; 2,0; 2,25; 2,5; 2,75; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 мМ или более и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных в табл. 2.

Согласно одному из вариантов реализации получают культуральную среду для экспрессии рекомбинантного белка ADAMTS (например, гADAMTS13), содержащую по меньшей мере 1 мкг/л меди и по меньшей мере 2 мг/л никотинамида (витамин В3). Согласно другим вариантам реализации указанная среда содержит по меньшей мере 2 мкг/л меди или по меньшей мере 4 мкг/л меди. Согласно другому варианту реализации, когда в среды добавляют медь, указанная культуральная среда также содержит по меньшей мере 7 мг/л никотинамида (витамина В3). Согласно одному из вариантов реализации указанная культуральная среда содержит точно или приблизительно от 2 до 10 мг/л никотинамида (витамина В3). Согласно другим вариантам реализации указанная культуральная среда может содержать по меньшей мере точно или приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мг/л или более высокие концентрации никотинамида (витамина В3). Согласно одному из вариантов реализации указанная культуральная среда содержит медь и никотинамид в концентрациях согласно любому из вариантов 1321-1760, приведенных в табл. 4.

Таблица 4. Типовые варианты реализации концентраций меди и никотинамида в культуральных средах, подходящих для экспрессии рекомбинантного белка ADAMTS13

|                      |                | Концентрация кальция |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                    |                    |               |
|----------------------|----------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|---------------|
|                      |                | ПММ<br>2<br>мг/мл    | ПММ<br>3<br>мг/мл | ПММ<br>4<br>мг/мл | ПММ<br>5<br>мг/мл | ПММ<br>6<br>мг/мл | ПММ<br>7<br>мг/мл | ПММ<br>8<br>мг/мл | ПММ<br>9<br>мг/мл | ПММ<br>10<br>мг/мл | ПММ<br>15<br>мг/мл | 2–10<br>мг/мл |
| Концентрации<br>меди | ПММ<br>1 мкг/л | Вар.<br>1321         | Вар.<br>1361      | Вар.<br>1401      | Вар.<br>1441      | Вар.<br>1481      | Вар.<br>1521      | Вар.<br>1561      | Вар.<br>1601      | Вар.<br>1641       | Вар.<br>1681       | Вар.<br>1721  |
|                      | ПММ<br>2 мкг/л | Вар.<br>1322         | Вар.<br>1362      | Вар.<br>1402      | Вар.<br>1442      | Вар.<br>1482      | Вар.<br>1522      | Вар.<br>1562      | Вар.<br>1602      | Вар.<br>1642       | Вар.<br>1682       | Вар.<br>1722  |
|                      | ПММ<br>3 мкг/л | Вар.<br>1323         | Вар.<br>1363      | Вар.<br>1403      | Вар.<br>1443      | Вар.<br>1483      | Вар.<br>1523      | Вар.<br>1563      | Вар.<br>1603      | Вар.<br>1643       | Вар.<br>1683       | Вар.<br>1723  |

|                             |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |
|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| ПММ<br>4 мкг/л              | Вар.<br>1324 | Вар.<br>1364 | Вар.<br>1404 | Вар.<br>1444 | Вар.<br>1484 | Вар.<br>1524 | Вар.<br>1564 | Вар.<br>1604 | Вар.<br>1644 | Вар.<br>1684 | Вар.<br>1724 |
| ПММ<br>5 мкг/л              | Вар.<br>1325 | Вар.<br>1365 | Вар.<br>1405 | Вар.<br>1445 | Вар.<br>1485 | Вар.<br>1525 | Вар.<br>1565 | Вар.<br>1605 | Вар.<br>1645 | Вар.<br>1685 | Вар.<br>1725 |
| ПММ<br>6 мкг/л              | Вар.<br>1326 | Вар.<br>1366 | Вар.<br>1406 | Вар.<br>1446 | Вар.<br>1486 | Вар.<br>1526 | Вар.<br>1566 | Вар.<br>1606 | Вар.<br>1646 | Вар.<br>1686 | Вар.<br>1726 |
| ПММ<br>7 мкг/л              | Вар.<br>1327 | Вар.<br>1367 | Вар.<br>1407 | Вар.<br>1447 | Вар.<br>1487 | Вар.<br>1527 | Вар.<br>1567 | Вар.<br>1607 | Вар.<br>1647 | Вар.<br>1687 | Вар.<br>1727 |
| ПММ<br>8 мкг/л              | Вар.<br>1328 | Вар.<br>1368 | Вар.<br>1408 | Вар.<br>1448 | Вар.<br>1488 | Вар.<br>1528 | Вар.<br>1568 | Вар.<br>1608 | Вар.<br>1648 | Вар.<br>1688 | Вар.<br>1728 |
| ПММ<br>9 мкг/л              | Вар.<br>1329 | Вар.<br>1369 | Вар.<br>1409 | Вар.<br>1449 | Вар.<br>1489 | Вар.<br>1529 | Вар.<br>1569 | Вар.<br>1609 | Вар.<br>1649 | Вар.<br>1689 | Вар.<br>1729 |
| ПММ<br>10 мкг/л             | Вар.<br>1330 | Вар.<br>1370 | Вар.<br>1410 | Вар.<br>1450 | Вар.<br>1490 | Вар.<br>1530 | Вар.<br>1570 | Вар.<br>1610 | Вар.<br>1650 | Вар.<br>1690 | Вар.<br>1730 |
| Приблизительно<br>1 мкг/л   | Вар.<br>1331 | Вар.<br>1371 | Вар.<br>1411 | Вар.<br>1451 | Вар.<br>1491 | Вар.<br>1531 | Вар.<br>1571 | Вар.<br>1611 | Вар.<br>1651 | Вар.<br>1691 | Вар.<br>1731 |
| Приблизительно<br>1,5 мкг/л | Вар.<br>1332 | Вар.<br>1372 | Вар.<br>1412 | Вар.<br>1452 | Вар.<br>1492 | Вар.<br>1532 | Вар.<br>1572 | Вар.<br>1612 | Вар.<br>1652 | Вар.<br>1692 | Вар.<br>1732 |
| Приблизительно<br>2 мкг/л   | Вар.<br>1333 | Вар.<br>1373 | Вар.<br>1413 | Вар.<br>1453 | Вар.<br>1493 | Вар.<br>1533 | Вар.<br>1573 | Вар.<br>1613 | Вар.<br>1653 | Вар.<br>1693 | Вар.<br>1733 |
| Приблизительно<br>2,5 мкг/л | Вар.<br>1334 | Вар.<br>1374 | Вар.<br>1414 | Вар.<br>1454 | Вар.<br>1494 | Вар.<br>1534 | Вар.<br>1574 | Вар.<br>1614 | Вар.<br>1654 | Вар.<br>1694 | Вар.<br>1734 |
| Приблизительно<br>3 мкг/л   | Вар.<br>1335 | Вар.<br>1375 | Вар.<br>1415 | Вар.<br>1455 | Вар.<br>1495 | Вар.<br>1535 | Вар.<br>1575 | Вар.<br>1615 | Вар.<br>1655 | Вар.<br>1695 | Вар.<br>1735 |
| Приблизительно<br>3,5 мкг/л | Вар.<br>1336 | Вар.<br>1376 | Вар.<br>1416 | Вар.<br>1456 | Вар.<br>1496 | Вар.<br>1536 | Вар.<br>1576 | Вар.<br>1616 | Вар.<br>1656 | Вар.<br>1696 | Вар.<br>1736 |
| Приблизительно<br>4 мкг/л   | Вар.<br>1337 | Вар.<br>1377 | Вар.<br>1417 | Вар.<br>1457 | Вар.<br>1497 | Вар.<br>1537 | Вар.<br>1577 | Вар.<br>1617 | Вар.<br>1657 | Вар.<br>1697 | Вар.<br>1737 |
| Приблизительно<br>4,5 мкг/л | Вар.<br>1338 | Вар.<br>1378 | Вар.<br>1418 | Вар.<br>1458 | Вар.<br>1498 | Вар.<br>1538 | Вар.<br>1578 | Вар.<br>1618 | Вар.<br>1658 | Вар.<br>1698 | Вар.<br>1738 |
| Приблизительно<br>5 мкг/л   | Вар.<br>1339 | Вар.<br>1379 | Вар.<br>1419 | Вар.<br>1459 | Вар.<br>1499 | Вар.<br>1539 | Вар.<br>1579 | Вар.<br>1619 | Вар.<br>1659 | Вар.<br>1699 | Вар.<br>1739 |
| Приблизительно<br>5,5 мкг/л | Вар.<br>1340 | Вар.<br>1380 | Вар.<br>1420 | Вар.<br>1460 | Вар.<br>1500 | Вар.<br>1540 | Вар.<br>1580 | Вар.<br>1620 | Вар.<br>1660 | Вар.<br>1700 | Вар.<br>1740 |
| Приблизительно<br>6 мкг/л   | Вар.<br>1341 | Вар.<br>1381 | Вар.<br>1421 | Вар.<br>1461 | Вар.<br>1501 | Вар.<br>1541 | Вар.<br>1581 | Вар.<br>1621 | Вар.<br>1661 | Вар.<br>1701 | Вар.<br>1741 |
| Приблизительно<br>7 мкг/л   | Вар.<br>1342 | Вар.<br>1382 | Вар.<br>1422 | Вар.<br>1462 | Вар.<br>1502 | Вар.<br>1542 | Вар.<br>1582 | Вар.<br>1622 | Вар.<br>1662 | Вар.<br>1702 | Вар.<br>1742 |
| Приблизительно<br>8 мкг/л   | Вар.<br>1343 | Вар.<br>1383 | Вар.<br>1423 | Вар.<br>1463 | Вар.<br>1503 | Вар.<br>1543 | Вар.<br>1583 | Вар.<br>1623 | Вар.<br>1663 | Вар.<br>1703 | Вар.<br>1743 |
| Приблизительно<br>9 мкг/л   | Вар.<br>1344 | Вар.<br>1384 | Вар.<br>1424 | Вар.<br>1464 | Вар.<br>1504 | Вар.<br>1544 | Вар.<br>1584 | Вар.<br>1624 | Вар.<br>1664 | Вар.<br>1704 | Вар.<br>1744 |
| Приблизительно<br>10 мкг/л  | Вар.<br>1345 | Вар.<br>1385 | Вар.<br>1425 | Вар.<br>1465 | Вар.<br>1505 | Вар.<br>1545 | Вар.<br>1585 | Вар.<br>1625 | Вар.<br>1665 | Вар.<br>1705 | Вар.<br>1745 |
| 1–20 мкг/л                  | Вар.<br>1346 | Вар.<br>1386 | Вар.<br>1426 | Вар.<br>1466 | Вар.<br>1506 | Вар.<br>1546 | Вар.<br>1586 | Вар.<br>1626 | Вар.<br>1666 | Вар.<br>1706 | Вар.<br>1746 |
| 2–20 мкг/л                  | Вар.<br>1347 | Вар.<br>1387 | Вар.<br>1427 | Вар.<br>1467 | Вар.<br>1507 | Вар.<br>1547 | Вар.<br>1587 | Вар.<br>1627 | Вар.<br>1667 | Вар.<br>1707 | Вар.<br>1747 |
| 1–10 мкг/л                  | Вар.<br>1348 | Вар.<br>1388 | Вар.<br>1428 | Вар.<br>1468 | Вар.<br>1508 | Вар.<br>1548 | Вар.<br>1588 | Вар.<br>1628 | Вар.<br>1668 | Вар.<br>1708 | Вар.<br>1748 |
| 2–10 мкг/л                  | Вар.<br>1349 | Вар.<br>1389 | Вар.<br>1429 | Вар.<br>1469 | Вар.<br>1509 | Вар.<br>1549 | Вар.<br>1589 | Вар.<br>1629 | Вар.<br>1669 | Вар.<br>1709 | Вар.<br>1749 |
| 1–6 мкг/л                   | Вар.<br>1350 | Вар.<br>1390 | Вар.<br>1430 | Вар.<br>1470 | Вар.<br>1510 | Вар.<br>1550 | Вар.<br>1590 | Вар.<br>1630 | Вар.<br>1670 | Вар.<br>1710 | Вар.<br>1750 |

|           |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |
|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 2–6 мкг/л | Вар.<br>1351 | Вар.<br>1391 | Вар.<br>1431 | Вар.<br>1471 | Вар.<br>1511 | Вар.<br>1551 | Вар.<br>1591 | Вар.<br>1631 | Вар.<br>1671 | Вар.<br>1711 | Вар.<br>1751 |
| 3–6 мкг/л | Вар.<br>1352 | Вар.<br>1392 | Вар.<br>1432 | Вар.<br>1472 | Вар.<br>1512 | Вар.<br>1552 | Вар.<br>1592 | Вар.<br>1632 | Вар.<br>1672 | Вар.<br>1712 | Вар.<br>1752 |
| 4–6 мкг/л | Вар.<br>1353 | Вар.<br>1393 | Вар.<br>1433 | Вар.<br>1473 | Вар.<br>1513 | Вар.<br>1553 | Вар.<br>1593 | Вар.<br>1633 | Вар.<br>1673 | Вар.<br>1713 | Вар.<br>1753 |
| 1–5 мкг/л | Вар.<br>1354 | Вар.<br>1394 | Вар.<br>1434 | Вар.<br>1474 | Вар.<br>1514 | Вар.<br>1554 | Вар.<br>1594 | Вар.<br>1634 | Вар.<br>1674 | Вар.<br>1714 | Вар.<br>1754 |
| 2–5 мкг/л | Вар.<br>1355 | Вар.<br>1395 | Вар.<br>1435 | Вар.<br>1475 | Вар.<br>1515 | Вар.<br>1555 | Вар.<br>1595 | Вар.<br>1635 | Вар.<br>1675 | Вар.<br>1715 | Вар.<br>1755 |
| 3–5 мкг/л | Вар.<br>1356 | Вар.<br>1396 | Вар.<br>1436 | Вар.<br>1476 | Вар.<br>1516 | Вар.<br>1556 | Вар.<br>1596 | Вар.<br>1636 | Вар.<br>1676 | Вар.<br>1716 | Вар.<br>1756 |
| 4–5 мкг/л | Вар.<br>1357 | Вар.<br>1397 | Вар.<br>1437 | Вар.<br>1477 | Вар.<br>1517 | Вар.<br>1557 | Вар.<br>1597 | Вар.<br>1637 | Вар.<br>1677 | Вар.<br>1717 | Вар.<br>1757 |
| 1–4 мкг/л | Вар.<br>1358 | Вар.<br>1398 | Вар.<br>1438 | Вар.<br>1478 | Вар.<br>1518 | Вар.<br>1558 | Вар.<br>1598 | Вар.<br>1638 | Вар.<br>1678 | Вар.<br>1718 | Вар.<br>1758 |
| 2–4 мкг/л | Вар.<br>1359 | Вар.<br>1399 | Вар.<br>1439 | Вар.<br>1479 | Вар.<br>1519 | Вар.<br>1559 | Вар.<br>1599 | Вар.<br>1639 | Вар.<br>1679 | Вар.<br>1719 | Вар.<br>1759 |
| 3–4 мкг/л | Вар.<br>1360 | Вар.<br>1400 | Вар.<br>1440 | Вар.<br>1480 | Вар.<br>1520 | Вар.<br>1560 | Вар.<br>1600 | Вар.<br>1640 | Вар.<br>1680 | Вар.<br>1720 | Вар.<br>1760 |

\*ПММ - по меньшей мере.

Согласно одному из вариантов реализации раствор культуры клеток также содержит низкую концентрацию аммония. Согласно одному из вариантов реализации указанная культуральная среда содержит аммоний в концентрации менее чем 10 мМ и медь и никотинамид в концентрациях согласно любому из вариантов 1321-1760, приведенных в табл. 4. Согласно конкретному варианту реализации концентрацию аммония поддерживают на уровне не выше 10 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно предпочтительному варианту реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации не выше 6 мМ и медь и никотинамид в концентрациях согласно любому из вариантов 1321-1760, приведенных в табл. 4. Согласно конкретному варианту реализации концентрацию аммония поддерживают на уровне не выше 6 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно другому предпочтительному варианту реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации не выше 5 мМ и медь и никотинамид в концентрациях согласно любому из вариантов 1321-1760, приведенных в табл. 4. Согласно конкретному варианту реализации концентрацию аммония поддерживают на уровне не выше 5 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно другому предпочтительному варианту реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации не выше 4 мМ и медь и никотинамид в концентрациях согласно любому из вариантов 1321-1760, приведенных в табл. 4. Согласно конкретному варианту реализации концентрацию аммония поддерживают на уровне не выше 4 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно другим вариантам реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации не выше 10 мМ или не выше 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 мМ или менее и медь и никотинамид в концентрациях согласно любому из вариантов 1321-1760, приведенных в табл. 4. Согласно еще одному конкретному варианту реализации концентрацию аммония в культуре клеток поддерживают на низком уровне на протяжении процесса (т.е. в течение всего времени, на протяжении которого указанная культура используется для получения гА13).

Согласно одному из вариантов реализации в среду для клеточной культуры добавляют медь, цинк и никотинамид. Согласно конкретному варианту реализации указанная культуральная среда содержит никотинамид в концентрации по меньшей мере 2 мг/мл и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441- 880, приведенных в табл. 2. Согласно другому конкретному варианту реализации указанная культуральная среда содержит никотинамид в концентрации по меньшей мере 7 мг/мл и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных в табл. 2. Согласно другому конкретному варианту реализации указанная культуральная среда содержит никотинамид в концентрации от 2 и 10 мг/мл, и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных в табл. 2. Согласно другим вариантам реализации культуральная среда содержит никотинамид в концентрации по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 мг/мл или более и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных в табл.2.

Согласно одному из вариантов реализации в среду для клеточной культуры добавляют медь, кальций и никотинамид. Согласно конкретному варианту реализации культуральная среда содержит никотинамид в концентрации по меньшей мере 2 мг/мл, и медь и кальций в концентрациях согласно любому из вариантов 881-1320, приведенных в табл. 3. Согласно другому конкретному варианту реализации культуральная среда содержит никотинамид в концентрации по меньшей мере 7 мг/мл и медь и кальций в концентрациях согласно любому из вариантов 881-1320, приведенных в табл. 3. Согласно другому конкретному варианту реализации культуральная среда содержит никотинамид в концентрации от 2 до 10 мг/мл и медь и кальций в концентрациях согласно любому из вариантов 881-1320, приведенных в табл. 3. Согласно другим вариантам реализации культуральная среда содержит никотинамид в концентрации по

меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 мг/мл или более и медь и кальций в концентрациях согласно любому из вариантов 881-1320, приведенных в табл. 3.

### III. Способы получения факторов крови с высокой удельной активностью.

#### А. Способы культивирования клеток.

Настоящее изобретение обеспечивает способы крупномасштабного производства рекомбинантных белков (таких как гVWF и гA13). Согласно определенным вариантам реализации в таких способах крупномасштабного производства применяют реакторы с мешалкой/перемешиванием для получения указанных терапевтических рекомбинантных белков.

Согласно определенным вариантам реализации способы согласно настоящему изобретению могут включать применение систем культивирования клеток в периодическом или непрерывном режиме. Например, в случае использования периодических культур клеток к ним может применяться режим однократного периодического культивирования, подпитываемого культивирования или повторного периодического культивирования. Сходным образом, к непрерывным культурам клеток может применяться, например, перфузионный, турбидостатический или хемотростический режим. Периодическое и непрерывное культивирование клеток может проводиться в условиях суспензионной или адгезионной культуры. В условиях суспензионного культивирования клетки свободно суспендированы и распределены в культуральной среде. Альтернативно, в условиях адгезионного культивирования, клетки связаны с твердой фазой, например микроносителем, пористым микроносителем, дисковым носителем, керамическим картриджем, полым волокном, плоской пластиной, гель-матрицей и т.п.

Периодическая культура представляет собой, как правило, крупномасштабную культуру клеток, в которой клеточный инокулят культивируют до максимальной плотности в реакторе или ферментере, и собирают и обрабатывают, как при однократном периодическом культивировании. Подпитываемая культура представляет собой, как правило, периодическую культуру, получающую либо свежие питательные вещества (например, ограничивающие рост субстраты), либо добавки (например, предшественники продуктов). Питательный раствор, как правило, является высококонцентрированным, чтобы избежать разбавления в биореакторе. В повторно-периодической культуре клетки помещают в культуральную среду и выращивают до требуемой плотности клеток. Затем, чтобы избежать наступления фазы спада и гибели клеток, культуру разбавляют полной ростовой средой до того, как клетки достигают максимальной концентрации. Количество и частота разведений широко варьирует и зависит от характеристик роста клеточной линии и удобства процесса культивирования. Указанный процесс может повторяться столько раз, сколько потребуется и, если клетки и среда не отбрасываются при пересеве, объем культуры будет увеличиваться ступенчато, по мере каждого следующего разведения. Вопрос увеличивающегося объема может быть решен использованием реактора, имеющего достаточный размер для разбавлений внутри указанного сосуда, либо распределением разбавленной культуры по нескольким сосудам. Принцип указанного типа культивирования состоит в поддержании клеток в экспоненциальной фазе роста. Серийно пересеваемая культура характеризуется тем, что объем указанной культуры всегда постепенно возрастает, может быть несколько сборов, клетки продолжают расти и указанный процесс может продолжаться так долго, как это необходимо. Согласно определенным вариантам реализации рекомбинантный белок ADAMTS (например, гADAMTS13) может быть выделен после сбора супернатанта периодической культуры. Согласно другим вариантам реализации рекомбинантный VWF может быть выделен после сбора супернатанта периодической культуры.

Непрерывная культура может представлять собой суспензионную культуру, непрерывно получающую питательные вещества за счет притока свежей среды, где, как правило, поддерживается постоянный объем культуры за счет сопутствующего удаления отработанной среды. Согласно хемотростическому и турбидостатическому методам извлеченная среда содержит клетки. Таким образом, клетки, остающиеся в сосуде для культивирования клеток, должны расти для поддержания стационарного состояния. Согласно хемотростическому способу скоростью роста, как правило, управляют посредством контроля степени разбавления, т.е. скорости добавления свежей среды. Скорость роста клеток в культуре может поддерживаться, например, на субмаксимальном уровне, изменением степени разбавления. Напротив, при турбидостатическом способе степень разбавления устанавливают таким образом, чтобы обеспечить максимальную скорость роста, которой могут достигнуть клетки при заданных технологических условиях, таких как pH и температура. Согласно определенным вариантам реализации гVWF или гA13 выделяют после сбора супернатанта непрерывной культуры. Типовой способ непрерывного культивирования клеток описан в WO 2011/012725 (Grillberger et al.), содержание которой включено в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте для любых целей.

При перфузионном культивировании извлеченная среда бедна клетками, которые остаются в культуральном сосуде, например, за счет применения способов фильтрации или центрифугирования, приводящих к повторному внесению клеток в культуру. Однако, как правило, используемые для фильтрации задерживают не 100% клеток, и таким образом часть их удаляется при извлечении среды. Очень высокие скорости роста для культивирования в режиме перфузии не критичны, так как большая часть клеток остается в культуральном сосуде. Согласно определенным вариантам реализации гVWF или гA13 выделяют после сбора супернатанта перфузионной культуры.

Реакционная система с баком-мешалкой может применяться для периодического и непрерывного культивирования клеток в суспензионном или адгезионном режимах. Как правило, указанная реакционная система с баком-мешалкой может эксплуатироваться так, как любой стандартный реактор с мешалкой с любым типом перемешивающего устройства, например, Rushton, гидравлический, с наклонными лопастями, или типа гребного винта.

Согласно определенным вариантам реализации способы культивирования клеток согласно настоящему изобретению могут включать применение микроносителя. Согласно некоторым вариантам реализации культивирование клеток согласно вариантам реализации изобретения может проводиться в больших биореакторах в условиях, подходящих для получения высоких удельных значений площадей поверхности относительно объема культуры для достижения высоких плотностей клеток и экспрессии белка. Один из способов обеспечения таких условий роста заключается в применении микроносителей для культивирования клеток в биореакторах с мешалкой. Принцип роста клеток на микроносителях впервые был описан у van Wezel (van Wezel A.L., Nature 216:64-5 (1967)); он обеспечивает прикрепление клеток к поверхности небольших твердых частиц, взвешенных в ростовой среде. Указанные способы обеспечивают высокое соотношение поверхность-объем и таким образом обеспечивают эффективную утилизацию питательных веществ. Кроме того, при экспрессии секретируемых белков в эукариотических клеточных линиях повышение соотношения поверхность-объем обеспечивает более высокие уровни секреции и таким образом более высокий выход белка в супернатанте культуры. Наконец, указанные способы позволяют легко увеличивать масштаб эукариотических экспрессионных культур.

Клетки, экспрессирующие vWF и/или tA13, могут быть связаны со сферическим или пористым микроносителем во время роста культуры клеток. Указанный микроноситель может представлять собой микроноситель, выбранный из группы микроносителей на основе декстрана, коллагена, пластика, желатина, целлюлозы и других, согласно описанию у Butler (1988. In: Spier & Griffiths, Animal Cell Biotechnology 3:283-303). Также возможно дорастивать клетки до некоторой биомассы на сферических микроносителях, и пересевать указанные клетки при достижении ими конечной для ферментера биомассы, перед получением экспрессированного белка, на пористый микроноситель, или наоборот. Подходящие сферические микроносители могут включать микроносители с гладкой поверхностью, такие как Cytodex™ 1, Cytodex™ 2, и Cytodex™ 3 (GE Healthcare) и крупнопористые микроносители такие как Cytopore™ 1, Cytopore™ 2, Cytoline™ 1 и Cytoline™ 2 (GE Healthcare).

Согласно приведенному выше описанию настоящее изобретение включает среды для клеточных культур, содержащие повышенную концентрацию меди. Понятно, что все варианты реализации изобретения и концентрации, описанные выше в разделе "Среды для клеточных культур", применимы к способам согласно настоящему изобретению, описываемых в настоящей заявке.

Согласно определенным вариантам реализации указанная культура может поддерживаться в течение по меньшей мере приблизительно 7 дней, или по меньшей мере приблизительно 14, 21, 28 дней, или по меньшей мере приблизительно 5, 6, 7, 8, 9 недель, или по меньшей мере приблизительно 2 или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 месяцев или дольше. Плотность клеток, которая поддерживается в культуре клеток для получения рекомбинантного белка vWF или рекомбинантного белка tA13, зависит от условий культивирования и среды, применяемых для экспрессии белка. Специалист в данной области техники легко сможет определить оптимальную плотность клеток для культивирования клеток с получением tVWF или tA13. Согласно одному из вариантов реализации плотность клеток в указанной культуре поддерживают на уровне от приблизительно  $0,5 \times 10^6$  до  $4 \times 10^7$  клеток/мл в течение длительного периода времени. Согласно другим вариантам реализации плотность клеток поддерживают на уровне концентрации от приблизительно  $1,0 \times 10^6$  до приблизительно  $1,0 \times 10^7$  клеток/мл в течение длительного периода времени. Согласно другим вариантам реализации плотность клеток поддерживают на уровне концентрации от приблизительно  $1,0 \times 10^6$  до приблизительно  $4,0 \times 10^6$  клеток/мл в течение длительного периода времени. Согласно другим вариантам реализации плотность клеток поддерживают на уровне концентрации от приблизительно  $1,0 \times 10^6$  до приблизительно  $4,0 \times 10^6$  клеток/мл в течение длительного периода времени. Согласно другим вариантам реализации плотность клеток может поддерживаться на уровне концентрации от приблизительно  $2,0 \times 10^6$  до приблизительно  $4,0 \times 10^6$  клеток/мл, или от приблизительно  $1,0 \times 10^6$  до приблизительно  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл, или от приблизительно  $1,5 \times 10^6$  до приблизительно  $3,5 \times 10^6$  клеток/мл, или в любом сходном диапазоне, в течение длительного периода времени.

Согласно одному из вариантов реализации плотность клеток непрерывной клеточной культуры, предложенной в соответствии с настоящим изобретением, поддерживают на уровне концентрации, не превышающей  $4,0 \times 10^6$  клеток/мл, в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно конкретному варианту реализации плотность клеток непрерывной клеточной культуры, предложенной в соответствии с настоящим изобретением, поддерживают на уровне концентрации, не превышающей  $4,0 \times 10^6$  клеток/мл, в течение по меньшей мере 14 дней. Согласно более конкретному варианту реализации плотность клеток непрерывной клеточной культуры, предложенной в соответствии с настоящим изобретением, поддерживают на уровне концентрации, не превышающей  $4,0 \times 10^6$  клеток/мл, в течение по меньшей мере 21 дня. Согласно еще одному более конкретному варианту реализации плотность клеток непрерывной клеточной





стоящим изобретением, поддерживают на уровне концентрации, не превышающей  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл, в течение по меньшей мере 14 дней. Согласно более конкретному варианту реализации плотность клеток непрерывной клеточной культуры, предложенной в соответствии с настоящим изобретением, поддерживают на уровне концентрации, не превышающей  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл, в течение по меньшей мере 21 дня. Согласно еще одному более конкретному варианту реализации плотность клеток непрерывной клеточной культуры, предложенной в соответствии с настоящим изобретением, поддерживают на уровне концентрации, не превышающей  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл, в течение по меньшей мере 28 дней. Согласно еще одному более конкретному варианту реализации плотность клеток непрерывной клеточной культуры, предложенной в соответствии с настоящим изобретением, поддерживают на уровне концентрации, не превышающей  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл, в течение по меньшей мере 5 недель. Согласно еще одному более конкретному варианту реализации плотность клеток непрерывной клеточной культуры, предложенной в соответствии с настоящим изобретением, поддерживают на уровне концентрации, не превышающей  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл, в течение по меньшей мере 6 недель. Согласно еще одному более конкретному варианту реализации плотность клеток непрерывной клеточной культуры, предложенной в соответствии с настоящим изобретением, поддерживают на уровне концентрации, не превышающей  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл, в течение по меньшей мере 7 недель. Согласно еще одному более конкретному варианту реализации плотность клеток непрерывной клеточной культуры, предложенной в соответствии с настоящим изобретением, поддерживают на уровне концентрации, не превышающей  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл, в течение по меньшей мере 8 недель. Согласно еще одному более конкретному варианту реализации плотность клеток непрерывной клеточной культуры, предложенной в соответствии с настоящим изобретением, поддерживают на уровне концентрации, не превышающей  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл, в течение по меньшей мере 9 недель.

Ниже приведены характерные детали способов получения rVWF и rA13. Следует понимать, что, хотя условия представлены конкретно для rVWF или rA13, указанные условия для rVWF могут применяться для получения rA13, и наоборот.

В. Способы получения высокомолекулярного рекомбинантного vWF.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится также к способам получения vWF в условиях клеточной культуры, включающих среду для клеточной культуры, содержащую повышенную концентрацию меди. Согласно определенным вариантам реализации указанная культура также содержит низкую концентрацию аммония. Используемый в настоящей заявке термин "культура клеток (клеточная культура)" и "раствор культуры клеток" применяют взаимозаменяемо.

Согласно одному из вариантов реализации настоящее изобретение обеспечивает способ получения высокомолекулярного рекомбинантного vWF, включающий: а) обеспечение культуры клеток; б) введение последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей vWF; в) отбор клеток, несущих указанную последовательность нуклеиновой кислоты; и д) осуществление экспрессии vWF в указанных клетках в условиях клеточной культуры, включающих среду для клеточной культуры, содержащую медь в концентрации по меньшей мере приблизительно 2,4 мкг/л, и супернатант культуры клеток, содержащий аммоний в концентрации менее чем приблизительно 1 мМ, причем указанный vWF представляет собой высокомультимерный vWF, содержащий от приблизительно 14 до приблизительно 22 димеров и обладающий удельной ристоцетиновой активностью по меньшей мере приблизительно 30 мЕ/мкг. Согласно дальнейшим вариантам реализации мультимерные rVWF, получаемый с применением способов согласно настоящему изобретению, содержат приблизительно 10-30, 12-28, 14-26, 16-24, 18-22, 20-21 димеров. Согласно дальнейшим вариантам реализации rVWF, получаемый согласно настоящему изобретению, обладает удельной активностью по меньшей мере приблизительно 20; 22,5; 25; 27,5; 30; 32,5; 35; 37,5; 40; 42,5; 45; 47,5; 50; 52,5; 55; 57,5; 60; 62,5; 65; 67,5; 70; 72,5; 75; 77,5; 80 или более мЕ/мкг. Согласно конкретному варианту реализации плотность клеток в непрерывной клеточной культуре для получения rVWF поддерживают на уровне концентрации, не превышающей  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл в течение длительного периода. Согласно другим конкретным вариантам реализации плотность клеток поддерживают на уровне не выше  $2,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл или менее. Согласно одному из вариантов реализации плотность клеток поддерживают в диапазоне от  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл и  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл.

Согласно одному из вариантов реализации настоящее изобретение обеспечивает способ получения композиции рекомбинантного фактора фон Виллебранда (rVWF); указанный способ включает этапы:

- (а) обеспечения основных сред для культуры клеток;
- (b) добавления в основные среды для клеточных культур меди до конечной концентрации меди по меньшей мере 2,0 мкг/л;
- (с) обеспечения одной или более клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую белок rVWF;
- (d) культивирования указанной одной или более клеток в среде для клеточных культур с добавлением меди таким образом, что происходит экспрессия и экскреция rVWF из клеток в культуральный супернатант; и
- (е) отделения по меньшей мере части указанного культурального супернатанта, причем указанный





поддерживают на уровне не выше 10 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно предпочтительному варианту реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации не выше 5 мМ. Согласно другому конкретному варианту реализации концентрацию аммония в растворе культуры клеток поддерживают на уровне концентрации аммония не выше 5 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно предпочтительному варианту реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации не выше 4 мМ. Согласно другому конкретному варианту реализации концентрацию аммония в культуре клеток поддерживают на уровне не выше 4 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно другим вариантам реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации не выше 10 мМ или не выше 9 мМ, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 мМ или менее. Согласно еще одному из вариантов реализации концентрацию аммония в растворе культуры клеток поддерживают на низком уровне на протяжении процесса (т.е. в течение всего времени, на протяжении которого указанная культура используется для получения rVWF). Согласно предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью rVWF, составляющей по меньшей мере 50 мЕ/мкг rVWF. Согласно более предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью rVWF, составляющей по меньшей мере 70 мЕ/мкг rVWF.

Согласно одному из вариантов реализации описанного выше способа в основные среды для клеточных культур добавляют медь до конечной концентрации меди от 4 до 7,5 мкг/л. Согласно одному из вариантов реализации раствор культуры клеток также содержит аммоний в концентрации менее чем 10 мМ. Согласно другому конкретному варианту реализации концентрацию аммония в культуре клеток поддерживают на уровне не выше 10 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно предпочтительному варианту реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации не выше 5 мМ. Согласно другому конкретному варианту реализации концентрацию аммония в культуре клеток поддерживают на уровне не выше 5 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно предпочтительному варианту реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации не выше 4 мМ. Согласно другому конкретному варианту реализации концентрацию аммония в культуре клеток поддерживают на уровне не выше 4 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно другим вариантам реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации не выше 10 мМ, или не выше 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или менее. Согласно еще одному из вариантов реализации концентрацию аммония в культуре клеток поддерживают на низком уровне на протяжении процесса (т.е. в течение всего времени, на протяжении которого указанная культура используется для получения rVWF). Согласно предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью rVWF, составляющей по меньшей мере 50 мЕ/мкг rVWF. Согласно более предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью rVWF, составляющей по меньшей мере 70 мЕ/мкг rVWF.

Согласно одному из вариантов реализации настоящее изобретение обеспечивает способ получения композиции рекомбинантного фактора фон Виллебранда (rVWF); указанный способ включает этапы: (a) обеспечения основных сред для культуры клеток; (b) добавления в основные среды для клеточных культур меди; (c) обеспечения одной или более клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую белок rVWF; (d) культивирования указанной одной или более клеток в среде для клеточных культур с добавлением меди таким образом, что происходит экспрессия и экскреция rVWF из клеток в культуральный супернатант; и (e) отделения по меньшей мере части указанного культурального супернатанта, причем концентрацию  $\text{NH}_4^+$  в указанном супернатанте поддерживают на низком уровне в течение по меньшей мере 7 дней, и при этом указанный отделенный супернатант также обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью rVWF, составляющей по меньшей мере 30 мЕ/мкг rVWF. Согласно конкретному варианту реализации концентрацию меди и концентрацию  $\text{NH}_4^+$  в растворе культуры клеток поддерживают на уровне концентраций согласно любому из вариантов 1-440, приведенных в табл. 1. Согласно предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью rVWF, составляющей по меньшей мере 50 мЕ/мкг rVWF. Согласно более предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью rVWF, составляющей по меньшей мере 70 мЕ/мкг rVWF.

Согласно одному из вариантов реализации описанного выше способа концентрацию меди и концентрацию  $\text{NH}_4^+$  в культуре клеток поддерживают на уровне концентрации согласно любому из вариантов 1-440, приведенных в табл. 1, в течение по меньшей мере 14 дней. Согласно предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью rVWF, составляющей по меньшей мере 50 мЕ/мкг rVWF. Согласно более предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью rVWF, составляющей по меньшей мере 70 мЕ/мкг rVWF.

Согласно одному из вариантов реализации описанного выше способа концентрацию меди и концентрацию  $\text{NH}_4^+$  в культуре клеток поддерживают на уровне концентрации согласно любому из вариантов 1-440, приведенных в табл. 1, в течение по меньшей мере 21 дня. Согласно предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью rVWF, составляющей по меньшей мере 50 мЕ/мкг rVWF. Согласно более предпочтительному варианту

реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью гVWF, составляющей по меньшей мере 70 МЕ/мкг гVWF.

Согласно одному из вариантов реализации описанного выше способа концентрацию меди и концентрацию  $\text{NH}_4^+$  в культуре клеток поддерживают на уровне концентрации согласно любому из вариантов 1-440, приведенных в табл. 1, в течение по меньшей мере 28 дней. Согласно предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью гVWF, составляющей по меньшей мере 50 МЕ/мкг гVWF. Согласно более предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью гVWF, составляющей по меньшей мере 70 МЕ/мкг гVWF.

Согласно одному из вариантов реализации описанного выше способа концентрацию меди и концентрацию  $\text{NH}_4^+$  в культуре клеток поддерживают на уровне концентрации согласно любому из вариантов 1-440, приведенных в табл. 1, в течение по меньшей мере 5 недель. Согласно предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью гVWF, составляющей по меньшей мере 50 МЕ/мкг гVWF. Согласно более предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью гVWF, составляющей по меньшей мере 70 МЕ/мкг гVWF.

Согласно одному из вариантов реализации описанного выше способа концентрацию меди и концентрацию  $\text{NH}_4^+$  в культуре клеток поддерживают на уровне концентрации согласно любому из вариантов 1-440, приведенных в табл. 1, в течение по меньшей мере 6 недель. Согласно предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью гVWF, составляющей по меньшей мере 50 МЕ/мкг гVWF. Согласно более предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью гVWF, составляющей по меньшей мере 70 МЕ/мкг гVWF.

Согласно одному из вариантов реализации описанного выше способа концентрацию меди и концентрацию  $\text{NH}_4^+$  в культуре клеток поддерживают на уровне концентрации согласно любому из вариантов 1-440, приведенных в табл. 1, в течение по меньшей мере 7 недель. Согласно предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью гVWF, составляющей по меньшей мере 50 МЕ/мкг гVWF. Согласно более предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью гVWF, составляющей по меньшей мере 70 МЕ/мкг гVWF.

Согласно одному из вариантов реализации описанного выше способа концентрацию меди и концентрацию  $\text{NH}_4^+$  в культуре клеток поддерживают на уровне концентрации согласно любому из вариантов 1-440, приведенных в табл. 1, в течение по меньшей мере 8 недель. Согласно предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью гVWF, составляющей по меньшей мере 50 МЕ/мкг гVWF. Согласно более предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью гVWF, составляющей по меньшей мере 70 МЕ/мкг гVWF.

Согласно одному из вариантов реализации описанного выше способа концентрацию меди и концентрацию  $\text{NH}_4^+$  в культуре клеток поддерживают на уровне концентраций согласно любому из вариантов 1-440, приведенных в табл. 1, в течение по меньшей мере 9 недель. Согласно предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью гVWF, составляющей по меньшей мере 50 МЕ/мкг гVWF. Согласно более предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью гVWF, составляющей по меньшей мере 70 МЕ/мкг гVWF.

Согласно одному из вариантов реализации настоящее изобретение обеспечивает способ получения композиции рекомбинантного фактора фон Виллебранда (гVWF); указанный способ включает этапы: (a) обеспечения основных сред для культуры клеток; (b) добавления в основные среды для клеточных культур меди до конечной концентрации меди, составляющей по меньшей мере 2,0 мкг/л; (c) обеспечения одной или более клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую белок гVWF; (d) культивирования указанной одной или более клеток в среде для клеточных культур с добавлением меди таким образом, что происходит экспрессия и экскреция гVWF из клеток в культуральный супернатант; (e) мониторинга концентрации аммония в указанном культуральном супернатанте; и (f) отделения по меньшей мере части культурального супернатанта, причем указанный культуральный супернатант, содержащий аммоний в концентрации более чем 10 мМ, не используют для получения композиции гVWF, и при этом указанный отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью гVWF, составляющей по меньшей мере 30 МЕ/мкг гVWF. Согласно определенным вариантам реализации конечная концентрация меди в дополненных основных культуральных средах составляет по меньшей мере 2,4, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мкг/л или более. Согласно другим вариантам реализации конечная концентрация меди в дополненных основных культуральных средах составляет 2-20, 2-10, 3-8 или 4-6 мкг/л. Согласно предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью гVWF, составляющей по меньшей мере 50 МЕ/мкг гVWF. Согласно более предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-

кофакторной активностью гVWF, составляющей по меньшей мере 70 мЕ/мкг гVWF.

Согласно одному из вариантов реализации описанного выше способа культуральный супернатант, содержащий аммоний в концентрации более чем 6 мМ, не используют для получения композиции гVWF. Согласно определенным вариантам реализации конечная концентрация меди в дополненных основных культуральных средах составляет по меньшей мере 2,4, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мкг/л или более. Согласно другим вариантам реализации конечная концентрация меди в дополненных основных культуральных средах составляет 2-20, 2-10, 3-8 или 4-6 мкг/л. Согласно предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью гVWF, составляющей по меньшей мере 50 мЕ/мкг гVWF. Согласно более предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью гVWF, составляющей по меньшей мере 70 мЕ/мкг гVWF.

Согласно одному из вариантов реализации описанного выше способа культуральный супернатант, содержащий аммоний в концентрации более чем 5 мМ, не используют для получения композиции гVWF. Согласно определенным вариантам реализации конечная концентрация меди в дополненных основных культуральных средах составляет по меньшей мере 2,4, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мкг/л или более. Согласно другим вариантам реализации конечная концентрация меди в дополненных основных культуральных средах составляет 2-20, 2-10, 3-8 или 4-6 мкг/л. Согласно предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью гVWF, составляющей по меньшей мере 50 мЕ/мкг гVWF. Согласно более предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью гVWF, составляющей по меньшей мере 70 мЕ/мкг гVWF.

Согласно одному из вариантов реализации описанного выше способа культуральный супернатант, содержащий аммоний в концентрации более чем 4 мМ, не используют для получения композиции гVWF. Согласно определенным вариантам реализации конечная концентрация меди в дополненных основных культуральных средах составляет по меньшей мере 2,4, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мкг/л или более. Согласно другим вариантам реализации конечная концентрация меди в дополненных основных культуральных средах составляет 2-20, 2-10, 3-8 или 4-6 мкг/л. Согласно предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью гVWF, составляющей по меньшей мере 50 мЕ/мкг гVWF. Согласно более предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью гVWF, составляющей по меньшей мере 70 мЕ/мкг гVWF.

Рекомбинантный vWF может быть получен посредством осуществления экспрессии в подходящей эукариотической системе-хозяине. Примеры эукариотических клеток включают, без ограничения, клетки млекопитающих, такие как CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Nep и HepG2; клетки насекомых, например, клетки SF9, клетки SF21, клетки S2 и клетки High Five; и дрожжевые клетки, например, клетки *Saccharomyces* или *Schizosaccharomyces*. Согласно одному из вариантов реализации можно осуществлять экспрессию указанного vWF в дрожжевых клетках, клетках насекомых, клетках птиц, клетках млекопитающих и т.п. Например, в линии клеток человека, линии клеток хомяка или линии клеток мыши. Согласно одному из конкретных вариантов реализации указанная клеточная линия представляет собой клеточную линию CHO, BHK или HEK. Как правило, для экспрессии vWF согласно настоящему изобретению применяют клетки млекопитающих, например, клетки CHO из непрерывной клеточной линии.

Согласно определенным вариантам реализации последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность, кодирующую vWF, может представлять собой вектор. Указанный вектор может доставляться вирусом или может представлять собой плазмиду. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая указанный белок, может представлять собой конкретный ген или его биологически функциональную часть. Согласно одному из вариантов реализации указанный белок представляет собой по меньшей мере биологически активную часть vWF.

Для экспрессии указанного vWF могут применяться разнообразные векторы; они могут быть выбраны из эукариотических экспрессионных векторов. Примеры векторов для эукариотической экспрессии включают: (i) векторы для экспрессии в дрожжах, такие как pAO, pPIC, pYES, pMET, с применением таких промоторов, как AOX1, GAP, GAL1, AUG1 и т.п.; (ii) векторы для экспрессии в клетках насекомых, такие как pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC и т.п, с применением таких промоторов, как PH, pIB, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh и т.п, и (iii) векторы для экспрессии в клетках млекопитающих, такие как pSVL, pCMV, pRc/RSV, pкДНК3, pBPV и т.п, и векторы, происходящие из вирусных систем, таких как вирус осповакцины, аденоассоциированные вирусы, герпесвирусы, ретровирусы и т.п, с применением таких промоторов, как CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV и β-актин. Типовой вектор для экспрессии гVWF описан у Kaufman et al. (Mol. Cell Biol. 1989 Mar;9(3):1233-42); содержание указанного источника включено в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте для любых целей.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, указанная последовательность нуклеиновой кислоты также содержит другие последовательности, подходящие для контролируемой экспрессии белка, такие как промоторные последовательности, энхансеры, ТАТА-боксы, сайты инициации транскрипции, полилинкеры, сайты рестрикции, поли-А-последовательности, последовательности процессин-

га белков, маркеры отбора и т.п., которые общеизвестны специалистам в данной области техники.

Помимо сред для клеточных культур, содержащих повышенную концентрацию меди, условия культивирования клеток согласно настоящему изобретению могут включать концентрацию аммония менее чем приблизительно 25 мМ на протяжении всего подготовительного процесса ("upstream"-процесса) в системах культивирования. Согласно одному из вариантов реализации условия культивирования клеток включают концентрацию аммония менее чем приблизительно 25 мМ, согласно другому варианту реализации менее чем приблизительно 20 мМ, согласно еще одному варианту реализации менее чем приблизительно 15 мМ, согласно еще одному варианту реализации менее чем приблизительно 10 мМ, и согласно дальнейшему варианту реализации менее чем приблизительно 5 мМ.

Согласно некоторым вариантам реализации концентрации аммония согласно настоящему изобретению поддерживают на постоянном уровне на протяжении всего подготовительного процесса в системе культивирования клеток. Клетки, применяемые согласно настоящему изобретению, могут культивироваться, например, способами, модифицированными относительно стандартных периодического культивирования и непрерывного культивирования, общеизвестных в данной области техники. При этом такие стандартные техники могут приводить к образованию высоких концентраций аммония в конце культивирования. В способах согласно настоящему изобретению эта проблема преодолена за счет применения систем производства, которые могут обеспечить постоянное поступление культуральной среды с помощью таких техник, как, например, перфузионное или хеостатическое культивирование. После культивирования клеток-хозяев vWF может быть выделен из отработанной среды с применением стандартных методик, таких как ультрафильтрация или центрифугирование. При необходимости vWF может быть очищен, например, ионообменной и/или эксклюзионной хроматографией и т.п.

Непрерывная культура (например, перфузионная или хеостатическая культура) может представлять собой суспензионную культуру, непрерывно получающую питательные вещества за счет притока свежей среды, при этом объем культуры, как правило, неизменен. Сходным образом, непрерывная ферментация может подразумевать процесс, при котором клетки или микроорганизмы в культуре поддерживают в экспоненциальной фазе роста за счет постоянного добавления свежей среды, точно компенсируемом удалением суспензии клеток из биореактора. Кроме того, реакционная система с баком-мешалкой может применяться для суспензионного, перфузионного, хеостатического культивирования и/или культивирования на микроносителях. Как правило, в качестве указанной реакционной системы с баком-мешалкой может работать любой стандартный реактор с баком-мешалкой с любым типом перемешивающего устройства, например, типа Rushton, гидравлическим, с наклонными лопастями, или типа гребного винта.

С. Способы получения рекомбинантного ADAMTS13 (A13).

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится также к способам получения rA13 в условиях клеточной культуры, включающих среду для клеточной культуры, содержащую повышенную концентрацию меди. Согласно определенным вариантам реализации указанная культура также содержит низкую концентрацию аммония.

Согласно одному из вариантов реализации настоящее изобретение обеспечивает способ получения композиции рекомбинантного ADAMTS13 (rA13); указанный способ включает этапы: (a) обеспечения основных сред для культуры клеток; (b) добавления в основные среды для клеточных культур меди до конечной концентрации меди, составляющей по меньшей мере 1,0 мкг/л; (c) обеспечения одной или более клеток, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок rA13; (d) культивирования указанной одной или более клеток в среде для клеточных культур с добавлением меди таким образом, что происходит экспрессия и экскреция rA13 из клеток в культуральный супернатант; и (e) отделения по меньшей мере части указанного культурального супернатанта, при этом в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 1500 единиц активности FRETS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день (т.е. 1500 единиц FRETS-VWF73 активности в день на литр культуры клеток; Р FRETS). Согласно определенным вариантам реализации конечная концентрация меди в дополненных основных культуральных средах составляет по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6 мкг/л или более. Согласно другим вариантам реализации конечная концентрация меди в дополненных основных культуральных средах составляет 1-6, 2-5, 2-4 или 3-4 мкг/л. Согласно предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2000 единиц активности FRETS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно более предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2500 единиц активности FRETS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 3000 единиц активности FRETS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно определенным вариантам реализации указанные способы обеспечивают устойчивое увеличение объемной продуктивности FRETS-VWF73 (Р FRETS). Например, согласно определенным вариантам реализации выделяют по меньшей мере 1500 единиц активности FRETS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур ежедневно в течение по меньшей мере 7 дней или по меньшей мере 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 или более

дней. Согласно предпочтительному варианту реализации по меньшей мере 2000 единиц активности FRETs-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур выделяют ежедневно в течение по меньшей мере 7 дней или по меньшей мере 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 или более дней. Согласно более предпочтительному варианту реализации по меньшей мере 2500 единиц активности FRETs-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур выделяют ежедневно в течение по меньшей мере 7 дней или по меньшей мере 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 или более дней. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации по меньшей мере 3000 единиц активности FRETs-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур выделяют ежедневно в течение по меньшей мере 7 дней или по меньшей мере 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 или более дней. Согласно конкретному варианту реализации плотность клеток в непрерывной клеточной культуре для продуцирования gA13 поддерживают на уровне концентрации, не превышающей  $4,0 \times 10^6$  клеток/мл в течение длительного периода. Согласно другим конкретным вариантам реализации плотность клеток поддерживают на уровне не выше  $3,5 \times 10^6$  клеток/мл,  $3,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл,  $2,0 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл,  $1,0 \times 10^6$  клеток/мл или менее. Согласно одному из вариантов реализации плотность клеток поддерживают на уровне от  $3,0 \times 10^6$  клеток/мл до  $4,0 \times 10^6$  клеток/мл.

Согласно одному варианту реализации описанных выше способов отделенный супернатант содержит по меньшей мере 4 единицы активности FRETs-VWF73 на мл супернатанта (FRETs). Согласно предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант содержит по меньшей мере 6 единиц активности FRETs-VWF73 на мл супернатанта. Согласно более предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант содержит по меньшей мере 8 единиц активности FRETs-VWF73 на мл супернатанта. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант содержит по меньшей мере 10 единиц активности FRETs-VWF73 на мл супернатанта. Согласно определенным вариантам реализации указанные способы обеспечивают устойчивое увеличение продуктивности FRETs. Например, согласно определенным вариантам реализации супернатант, обладающий по меньшей мере 4 единицами активности FRETs-VWF73 на мл, выделяют ежедневно в течение по меньшей мере 7 дней или по меньшей мере 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 или более дней. Согласно предпочтительному варианту реализации супернатант, обладающий по меньшей мере 6 единицами активности FRETs-VWF73 на мл, выделяют ежедневно в течение по меньшей мере 7 дней или по меньшей мере 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 или более дней. Согласно более предпочтительному варианту реализации супернатант, обладающий по меньшей мере 8 единицами активности FRETs-VWF73 на мл, выделяют ежедневно в течение по меньшей мере 7 дней, или по меньшей мере 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 или более дней. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации супернатант, обладающий по меньшей мере 10 единицами активности FRETs-VWF73 на мл, выделяют ежедневно в течение по меньшей мере 7 дней или по меньшей мере 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 или более дней.

Согласно одному варианту реализации описанных выше способов культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 800 мЕ FRETs-VWF73 активности на  $10^6$  клеток культуры в день (т.е. q Frets). Согласно предпочтительному варианту реализации культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 1 Е FRETs-VWF73 активности на  $10^6$  клеток культуры в день. Согласно более предпочтительному варианту реализации культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 1,2 Е FRETs-VWF73 активности на  $10^6$  клеток культуры в день. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 1,4 Е FRETs-VWF73 активности на  $10^6$  клеток культуры в день. Согласно определенным вариантам реализации указанные способы обеспечивают устойчивое увеличение удельной продуктивности FRETs-VWF73 на клетку (q Frets). Например, согласно определенным вариантам реализации культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 800 мЕ FRETs-VWF73 активности на  $10^6$  клеток культуры ежедневно в течение по меньшей мере 7 дней или по меньшей мере 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 или более дней.

Согласно предпочтительному варианту реализации культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 1 Е FRETs-VWF73 активности на  $10^6$  клеток культуры ежедневно в течение по меньшей мере 7 дней или по меньшей мере 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 или более дней. Согласно более предпочтительному варианту реализации культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 1,2 Е FRETs-VWF73 активности на  $10^6$  клеток культуры ежедневно в течение по меньшей мере 7 дней или по меньшей мере 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 или более дней. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 1,4 Е FRETs-VWF73 активности на  $10^6$  клеток культуры ежедневно в течение по меньшей мере 7 дней или по меньшей мере 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 или более дней.

Согласно одному варианту реализации описанных выше способов культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 1 мг gA13, согласно ИФА-анализу, на литр культуры в день (P ELISA). Согласно предпочтительному варианту реализации культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 1,5 мг gA13, согласно ИФА-анализу, на литр культуры в день. Согласно более предпочтительному варианту реализации культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 2 мг gA13, согласно ИФА-анализу, на литр культуры в день. Согласно определенным вариантам реализации указан-

ные способы обеспечивают устойчивое увеличение выработки гA13. Например, согласно определенным вариантам реализации культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 1 мг гA13, согласно ИФА-анализу, на литр культуры ежедневно в течение по меньшей мере 7 дней, или по меньшей мере 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 или более дней. Согласно предпочтительному варианту реализации культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 1,5 мг гA13, согласно ИФА-анализу, на литр культуры ежедневно в течение по меньшей мере 7 дней, или по меньшей мере 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 или более дней. Согласно более предпочтительному варианту реализации культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 2 мг гA13, согласно ИФА-анализу, на литр культуры ежедневно в течение по меньшей мере 7 дней или по меньшей мере 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 или более дней.

Согласно одному варианту реализации описанных выше способов культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 0,5 мкг гA13, согласно ИФА-анализу, на  $10^6$  клеток культуры в день (т.е. q ELISA). Согласно предпочтительному варианту реализации культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 0,7 мкг гA13, согласно ИФА-анализу, на  $10^6$  клеток культуры в день. Согласно более предпочтительному варианту реализации культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 0,9 мкг гA13, согласно ИФА-анализу, на  $10^6$  клеток культуры в день. Согласно определенным вариантам реализации указанные способы обеспечивают устойчивое увеличение выработки согласно q ELISA. Например, согласно определенным вариантам реализации культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 0,5 мкг гA13, согласно ИФА-анализу, на  $10^6$  клеток культуры ежедневно в течение по меньшей мере 7 дней или по меньшей мере 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 или более дней. Согласно предпочтительному варианту реализации культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 0,7 мкг гA13, согласно ИФА-анализу, на  $10^6$  клеток культуры ежедневно в течение по меньшей мере 7 дней или по меньшей мере 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 или более дней. Согласно более предпочтительному варианту реализации культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 0,9 мкг гA13, согласно ИФА-анализу, на  $10^6$  клеток культуры ежедневно в течение по меньшей мере 7 дней или по меньшей мере 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 или более дней.

Согласно одному варианту реализации описанных выше способов отделенный супернатант содержит по меньшей мере 3 мкг гA13, согласно ИФА-анализу, на мл супернатанта. Согласно предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант содержит по меньшей мере 4 мкг гA13, согласно ИФА-анализу, на мл супернатанта. Согласно более предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант содержит по меньшей мере 5 мкг гA13, согласно ИФА-анализу, на мл супернатанта. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант содержит по меньшей мере 6 мкг гA13, согласно ИФА-анализу, на мл супернатанта. Согласно определенным вариантам реализации указанные способы обеспечивают устойчивое увеличение выработки гA13. Например, согласно определенным вариантам реализации супернатант, обладающий по меньшей мере 3 мкг гA13 на мл, выделяют ежедневно в течение по меньшей мере 7 дней или по меньшей мере 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 или более дней. Согласно предпочтительному варианту реализации супернатант, обладающий по меньшей мере 4 мкг гA13 на мл, выделяют ежедневно в течение по меньшей мере 7 дней или по меньшей мере 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 или более дней. Согласно более предпочтительному варианту реализации супернатант, обладающий по меньшей мере 5 мкг гA13 на мл, выделяют ежедневно в течение по меньшей мере 7 дней или по меньшей мере 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 или более дней. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации супернатант, обладающий по меньшей мере 6 мкг гA13 на мл, выделяют ежедневно в течение по меньшей мере 7 дней или по меньшей мере 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 или более дней.

Согласно одному варианту реализации описанных выше способов раствор культуры клеток также содержит аммоний в концентрации менее чем 10 мМ. Согласно другому конкретному варианту реализации концентрацию аммония в культуре клеток поддерживают на уровне не выше 10 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно предпочтительному варианту реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации не выше 5 мМ. Согласно другому конкретному варианту реализации концентрацию аммония в культуре клеток поддерживают на уровне не выше 5 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно предпочтительному варианту реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации не выше 4 мМ. Согласно другому конкретному варианту реализации концентрацию аммония в культуре клеток поддерживают на уровне не выше 4 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно другим вариантам реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации не выше 10 мМ или не выше 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 мМ или менее. Согласно еще одному из вариантов реализации концентрацию аммония в культуре клеток поддерживают на низком уровне на протяжении процесса (т.е. в течение всего времени, на протяжении которого указанная культура используется для получения гA13). Согласно конкретному варианту реализации культуральный раствор содержит медь и аммоний в концентрации согласно любому из вариантов 1-440, приведенных в табл. 1.

Согласно одному из вариантов реализации настоящее изобретение обеспечивает способ получения композиции рекомбинантного ADAMTS13 (гA13); указанный способ включает этапы: (a) обеспечения основных сред для культуры клеток; (b) добавления в основные среды для клеточных культур меди и цинка; (c) обеспечения одной или более клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую белок

гA13; (d) культивирования указанной одной или более клеток в среде для клеточных культур с добавлением меди таким образом, что происходит экспрессия и экскреция гA13 из клеток в культуральный супернатант; и (e) отделения по меньшей мере части указанного культурального супернатанта, при этом в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 1500 единиц активности FRET-S-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно одному из вариантов реализации указанная культуральная среда содержит по меньшей мере 1 мкг/л меди и по меньшей мере 2 мкМ цинк. Согласно другим вариантам реализации указанная среда содержит по меньшей мере 2 мкг/л меди или по меньшей мере 4 мкг/л меди. Согласно одному варианту реализации, когда в среды добавляют медь, указанная культуральная среда также содержит по меньшей мере точно или приблизительно 5 мкМ цинка. Согласно одному из вариантов реализации указанная культуральная среда также содержит точно или приблизительно от 2 до 12 мкМ цинка. Согласно другому варианту реализации указанная культуральная среда также содержит точно или приблизительно от 5 до 12 мкМ цинка. Согласно другим вариантам реализации указанная культуральная среда также может содержать по меньшей мере точно или приблизительно 2 мкМ, или по меньшей мере точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или более, цинка. Согласно одному из вариантов реализации указанная культуральная среда содержит медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных в табл. 2. Согласно предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2000 единиц активности FRET-S-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно более предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2500 единиц активности FRET-S-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 3000 единиц активности FRET-S-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день.

Согласно одному из вариантов реализации настоящее изобретение обеспечивает способ получения композиции рекомбинантного ADAMTS13 (гA13); указанный способ включает этапы:

- (a) обеспечения основных сред для культуры клеток;
- (b) добавления в основные среды для клеточных культур меди и кальция;
- (c) обеспечения одной или более клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую белок гA13;
- (d) культивирования указанной одной или более клеток в среде для клеточных культур с добавлением меди таким образом, что происходит экспрессия и экскреция гA13 из клеток в культуральный супернатант; и

(e) отделения по меньшей мере части указанного культурального супернатанта, при этом в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 1500 единиц активности FRET-S-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день.

Согласно одному из вариантов реализации указанная культуральная среда содержит по меньшей мере 1 мкг/л меди и по меньшей мере 0,5 мМ кальция. Согласно другим вариантам реализации указанная среда содержит по меньшей мере 2 мкг/л меди или по меньшей мере 4 мкг/л меди. Согласно другому варианту реализации, когда в среды добавляют медь, указанная культуральная среда также содержит по меньшей мере 1,5 мМ кальция. Согласно одному из вариантов реализации указанная культуральная среда содержит точно или приблизительно от 0,5 до 1,5 мМ кальция. Согласно другим вариантам реализации указанная культуральная среда может содержать по меньшей мере точно или приблизительно 0,5 мМ или по меньшей мере точно или приблизительно 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8; 1,9; 2,0; 2,25; 2,5; 2,75; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 мМ или более кальция. Согласно одному из вариантов реализации указанная культуральная среда содержит медь и кальций в концентрации согласно любому из вариантов 881-1320, приведенных в табл. 3. Согласно предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2000 единиц активности FRET-S-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно более предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2500 единиц активности FRET-S-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 3000 единиц активности FRET-S-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день.

Согласно одному из вариантов реализации настоящее изобретение обеспечивает способ получения композиции рекомбинантного ADAMTS13 (гA13); указанный способ включает этапы: (a) обеспечения основных сред для культуры клеток; (b) добавления в основные среды для клеточных культур меди, цинка и кальция; (c) обеспечения одной или более клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую белок гA13; (d) культивирования указанной одной или более клеток в среде для клеточных культур с добавлением меди таким образом, что происходит экспрессия и экскреция гA13 из клеток в культуральный супернатант; и (e) отделения по меньшей мере части указанного культурального супернатанта, при этом в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 1500 единиц активности

FRETS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно одному из вариантов реализации культуральная среда содержит кальций в концентрации по меньшей мере 0,5 мМ, и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных в табл. 2. Согласно другому конкретному варианту реализации культуральная среда содержит кальций в концентрации по меньшей мере 1,5 мМ, и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных в табл. 2. Согласно другому конкретному варианту реализации указанная культуральная среда содержит кальций в концентрации от 0,5 и 1,5 мМ, и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных в табл. 2. Согласно другим вариантам реализации культуральная среда содержит кальций в концентрации по меньшей мере 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8; 1,9; 2,0; 2,25; 2,5; 2,75; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 мМ или более и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных в табл. 2. Согласно предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2000 единиц активности FRETS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно более предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2500 единиц активности FRETS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 3000 единиц активности FRETS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день.

Согласно одному из вариантов реализации изобретение обеспечивает способ получения композиции рекомбинантного ADAMTS13 (rA13); указанный способ включает этапы: (а) обеспечения основных сред для культуры клеток; (b) добавления в основные среды для клеточных культур меди и никотинамида; (c) обеспечения одной или более клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую белок rA13; (d) культивирования указанной одной или более клеток в среде для клеточных культур с добавлением меди таким образом, что происходит экспрессия и экскреция rA13 из клеток в культуральный супернатант; и (e) отделения по меньшей мере части указанного культурального супернатанта, при этом в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 1500 единиц активности FRETS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно одному из вариантов реализации указанная культуральная среда содержит по меньшей мере 1 мкг/л меди и по меньшей мере 2 мг/л никотинамида (витамина В3). Согласно другим вариантам реализации указанная среда содержит по меньшей мере 2 мкг/л меди или по меньшей мере 4 мкг/л меди. Согласно другому варианту реализации, когда в среды добавляют медь, указанная культуральная среда также содержит по меньшей мере 7 мг/л никотинамида (витамина В3). Согласно одному из вариантов реализации указанная культуральная среда содержит точно или приблизительно от 2 до 10 мг/л никотинамида (витамина В3). Согласно другим вариантам реализации указанная культуральная среда может содержать по меньшей мере точно или приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мг/л или более высокие концентрации никотинамида (витамина В3). Согласно одному из вариантов реализации указанная культуральная среда содержит медь и никотинамид в концентрациях согласно любому из вариантов 1321-1760, приведенных в табл. 4. Согласно предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2000 единиц активности FRETS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно более предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2500 единиц активности FRETS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 3000 единиц активности FRETS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день.

Согласно одному из вариантов реализации настоящее изобретение обеспечивает способ получения композиции рекомбинантного ADAMTS13 (rA13); указанный способ включает этапы:

- (a) обеспечения основных сред для культуры клеток;
- (b) добавления в основные среды для клеточных культур меди, цинка и никотинамида;
- (c) обеспечения одной или более клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую белок rA13;
- (d) культивирования указанной одной или более клеток в среде для клеточных культур с добавлением меди таким образом, что происходит экспрессия и экскреция rA13 из клеток в культуральный супернатант; и

(e) отделения по меньшей мере части указанного культурального супернатанта, при этом в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 1500 единиц активности FRETS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день.

Согласно одному из вариантов реализации указанная среда для клеточной культуры содержит никотинамид в концентрации по меньшей мере 2 мг/мл и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных в табл. 2. Согласно другому конкретному варианту реализации указанная культуральная среда содержит никотинамид в концентрации по меньшей мере 7 мг/мл и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных в табл. 2. Согласно другому конкретному варианту реализации указанная культуральная среда содержит никотинамид в концентрации от

2 и 10 мг/мл, и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных в табл. 2. Согласно другим вариантам реализации указанная культуральная среда содержит никотинамид в концентрации по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 мг/мл или более и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных в табл. 2. Согласно предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2000 единиц активности FRETTS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно более предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2500 единиц активности FRETTS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 3000 единиц активности FRETTS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день.

Согласно одному из вариантов реализации настоящее изобретение обеспечивает способ получения композиции рекомбинантного ADAMTS13 (rA13); указанный способ включает этапы: (a) обеспечения основных сред для культуры клеток; (b) добавления в основные среды для клеточных культур меди, кальция и никотинамида; (c) обеспечения одной или более клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую белок rA13; (d) культивирования указанной одной или более клеток в среде для клеточных культур с добавлением меди таким образом, что происходит экспрессия и экскреция rA13 из клеток в культуральный супернатант; и (e) отделения по меньшей мере части указанного культурального супернатанта, причем в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 1500 единиц активности FRETTS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно одному из вариантов реализации среда для клеточной культуры содержит никотинамид в концентрации по меньшей мере 2 мг/мл, и медь и кальций в концентрациях согласно любому из вариантов 881-1320, приведенных в табл. 3. Согласно другому конкретному варианту реализации культуральная среда содержит никотинамид в концентрации по меньшей мере 7 мг/мл и медь и кальций в концентрациях согласно любому из вариантов 881-1320, приведенных в табл. 3. Согласно другому конкретному варианту реализации указанная культуральная среда содержит никотинамид в концентрации от 2 и 10 мг/мл, и медь и кальций в концентрациях согласно любому из вариантов 881-1320, приведенных в табл. 3. Согласно другим вариантам реализации указанная культуральная среда содержит никотинамид в концентрации по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 мг/мл или более и медь и кальций в концентрациях согласно любому из вариантов 881-1320, приведенных в табл. 3. Согласно предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2000 единиц активности FRETTS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно более предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2500 единиц активности FRETTS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 3000 единиц активности FRETTS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день.

Рекомбинантные белки ADAMTS могут быть получены посредством осуществления экспрессии в любой подходящей прокариотической или эукариотической системе-хозяине. Примеры эукариотических клеток включают, без ограничения, клетки млекопитающих, такие как CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Nep, и HepG2; клетки насекомых, например SF9 клетки, SF21 клетки, S2 клетки, и High Five клетки; и дрожжевые клетки, например, клетки *Saccharomyces* или *Schizosaccharomyces*. Согласно одному из вариантов реализации указанные белки ADAMTS можно экспрессировать в бактериальных клетках, дрожжевых клетках, клетках насекомых, клетках птиц, клетках млекопитающих и т.п. Например, в линии клеток человека, линии клеток хомяка или линии клеток мыши. Согласно одному из конкретных вариантов реализации указанная клеточная линия представляет собой клеточную линию CHO, BHK или HEK. Согласно предпочтительному варианту реализации клеточная линия представляет собой клеточную линию CHO. Согласно конкретному варианту реализации клоны CHO, способные к стабильной экспрессии rA13, получают ко-трансфекцией клетки CHO кодирующими последовательностями rA13 и дигидрофолатредуктазы (например, мышинного гена *dhfr*) и отбором при росте в присутствии возрастающих уровней метотрексата.

Согласно одному из вариантов реализации указанные клетки могут представлять собой любые клетки млекопитающих, пригодные для культивирования, предпочтительно в ходе производственного процесса (т.е. по меньшей мере в 10 л, предпочтительно по меньшей мере в 100 л), для получения требуемого белка ADAMTS, такого как ADAMTS13. Примеры включают линию клеток почки обезьяны CV1, трансформированную SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линию эмбриональных клеток почек человека (клетки 293 или 293 субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., J. Gen Virol, 36:59 (1977)); клетки почки новорожденного хомяка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомячка/-DHFR, такие как субклон DUKX-B11 (CHO, Uriaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 77:4216 (1980)); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, Biol. Reprod, 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HeLa, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC

CCL 34); клетки печени крыс Буффало (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); опухоли молочной железы мышей (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44-68 (1982)); клетки MRC 5; клетки FS4; и линию гепатомы человека (Hep G2). Предпочтительно, клеточная линия представляет собой линию клеток грызунов, в частности линию клеток хомяка, такую как CHO или BHK.

Значительное число векторов может применяться для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13) и может быть выбрано из эукариотических и прокариотических экспрессионных векторов. Согласно определенным вариантам реализации плазмидный вектор предназначен для применения в экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13). Как правило, плазмидные векторы, содержащие репликон и управляющие последовательности, полученные из видов, совместимых с клеткой-хозяином, применяют в соединении с указанными хозяевами. Указанный вектор может нести сайт репликации, а также маркерные последовательности, способные обеспечивать фенотипический отбор в трансформированных клетках. Плазида содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), функционально связанную с одной или более контрольной последовательностью, например, промотором.

Предпочтительный способ получения стабильных клонов клеток CHO, экспрессирующих рекомбинантный белок ADAMTS, следующий. Дефицитную по DHFR клеточную линию CHO DUKX-B11 трансфицируют DHFR-экспрессионным вектором, чтобы обеспечить экспрессию соответствующего рекомбинантного белка. Типовой способ описан у Plaimauer et al. (*Blood*, 2002 Nov 15;100(10):3626-32. Epub 2002 Jul 12), содержание которого включено в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте для любых целей. Отбор проводят культивированием в не содержащих гипоксантин/тимидин (HT) средах; амплификации соответствующей области, кодирующей экспрессию рекомбинантного белка ADAMTS и DHFR гена, достигают размножением клеток в возрастающих концентрациях метотрексата. При необходимости клеточные линии CHO могут быть адаптированы для роста в не содержащей сыворотки и/или белков среде, по существу, согласно описанию в US 6100061 (Reiter et al., *Immuno Aktiengesellschaft*).

Согласно другому предпочтительному варианту реализации стабильные HEK293 клетки получают, трансфицируя их конструкцией, содержащей селективируемый маркер устойчивости к гигромицину, и отбирая трансформанты по устойчивости к антибиотику.

Способность определенных вирусов инфицировать клетки или проникать в клетки посредством опосредованного рецепторами эндоцитоза, встраиваться в геном клетки-хозяина и стабильно и эффективно экспрессировать вирусные гены, делает их привлекательными кандидатами для переноса чужеродных нуклеиновых кислот в клетки (например, клетки млекопитающих). Соответственно, согласно определенным вариантам реализации вирусный вектор применяют для введения нуклеотидной последовательности, кодирующей белок ADAMTS (например, ADAMTS13) в клетку-хозяина для экспрессии. Указанный вирусный вектор должен содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), функционально связанную с одной или более контрольной последовательностью, например промотором. Как вариант, указанный вирусный вектор может не содержать контрольную последовательность, вместо этого используя контрольную последовательность клетки-хозяина для управления экспрессией белка ADAMTS. Неограничивающие примеры вирусных векторов, которые могут применяться для доставки нуклеиновой кислоты, включают аденовирусные векторы, AAV-векторы и ретровирусные векторы.

Согласно одному из вариантов реализации аденовирусный экспрессионный вектор включают конструкции, содержащие аденовирусные последовательности, достаточные для осуществления упаковки указанной конструкции и гарантированной экспрессии клонированной в нее конструкции ADAMTS. Аденовирусные векторы позволяют вводить чужеродные последовательности размером до 7 т.п.н. (Grunhaus et al., *Seminar in Virology*, 200(2): 53 5-546, 1992)).

Согласно другому варианту реализации аденоассоциированный вирус (AAV) может применяться для введения нуклеотидной последовательности, кодирующей белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в клетку-хозяина для экспрессии. AAV-системы описывались ранее и, как правило, общеизвестны в данной области техники (Kelleher and Vos, *Biotechniques*, 17(6): 1110-7, 1994; Cotten et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(13):6094-6098, 1992; Curiel, *Nat. Immun.*, 13(2-3): 141-64, 1994; Muzyczka, *Curr. TopMicrobiol. Immunol.*, 158:97-129, 1992). Детали получения и применения rAAV-векторов описаны, например, в патентах США № 5139941 и 4797368, включенных в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте и для любых целей.

Согласно одному из вариантов реализации ретровирусный экспрессионный вектор может применяться для введения нуклеотидной последовательности, кодирующей белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в клетку-хозяина для экспрессии. Указанные системы были описаны ранее и в целом общеизвестны в данной области техники (Mann et al., *Cell*, 33:153-159, 1983; Nicolas and Rubinstein, в: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 494-513, 1988; Temin, в: *Gene Transfer*, Kucherlapati (ed.), New York: Plenum Press, pp. 149-188, 1986). Согласно конкретному варианту реализации ретровирусный вектор представляет собой лентиви-

русный вектор (см., например, Naldini et al., Science, 272(5259):263-267, 1996; Zufferey et al., Nat. Biotechnol., 15(9):871-875, 1997; Blomer et al., J. Virol., 71(9):6641-6649, 1997; патенты США № 6013516 и 5994136).

Неограничивающие примеры векторов для прокариотической экспрессии включают плазмиды, такие как pRSET, pET, pBAD и т.п. при этом промоторы, применяемые в прокариотических экспрессионных векторах, включают lac, trc, trp, gcsA, araBAD и т.п. Примеры векторов для эукариотической экспрессии включают:

(i) векторы для экспрессии в дрожжах, такие как pAO, pPIC, pYES, pMET, с применением таких промоторов, как AOX1, GAP, GAL1, AUG1, и т.п.;

(ii) векторы для экспрессии в клетках насекомых, такие как pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC и т.п. с применением таких промоторов, как PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh и т.п. и

(iii) векторы для экспрессии в клетках млекопитающих, такие как pSVL, pCMV, pRc/RSV, pкДНК3, pBPV и т.п. и векторы, происходящие из вирусных систем, таких как вирус осповакцины, аденоассоциированные вирусы, герпесвирусы, ретровирусы и т.п. с применением таких промоторов, как CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV и β-актина. Типовой вектор для экспрессии rA13 описан у Plaimauer et al. (Blood. 2002 Nov 15;100(10):3626-32. Epub 2002 Jul 12); содержание указанного источника включено в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте для любых целей.

Согласно определенным вариантам реализации способы культивирования клеток согласно настоящему изобретению могут включать применение микроносителя. Настоящее изобретение обеспечивает, наряду с прочими аспектами, способы крупномасштабной экспрессии белка ADAMTS. Согласно некоторым вариантам реализации культивирование клеток согласно вариантам реализации изобретения может проводиться в больших биореакторах в условиях, подходящих для получения высокого отношения поверхности к объему в культуре для достижения высокой плотности клеток и экспрессии белка. Одним из способов обеспечения таких условий роста является применение микроносителей для культивирования клеток в биореакторах с мешалкой. Согласно другому варианту реализации указанные ростовые потребности удовлетворяются посредством применения суспензионной культуры клеток.

#### IV. Конкретные варианты реализации.

##### А. Рекombинантный фактор фон Виллебранда (rVWF).

Рекombинантный vWF можно экспрессировать в клетках млекопитающих, но удельная активность vWF может широко варьировать в зависимости от условий культивирования клеток; не было показано, что она сравнима или равна таковой vWF, выделенного из плазмы крови. Настоящее изобретение основано частично на неожиданном открытии, что среды для клеточных культур, содержащие по меньшей мере 2,4 мкг/л меди, обеспечивают благоприятный эффект, способствуя экспрессии высокомолекулярного vWF, имеющего высокую удельную активность. В частности, высокомолекулярный рекombинантный vWF согласно настоящему изобретению может включать высокомультимерную форму, содержащую от приблизительно 14 до приблизительно 22 димеров и обладающую удельной ристоцетиновой активностью, составляющей по меньшей мере приблизительно 30 МЕ/мкг. Процессы культивирования клеток согласно настоящему изобретению также позволяют поддерживать низкие уровни  $\text{NH}_4^+$  (например, менее чем 10 mM) во время подготовительного процесса в системах культивирования клеток, уменьшая таким образом пагубные эффекты на посттрансляционные модификации. Предполагается, что согласно настоящему изобретению впервые предложены условия клеточных культур, включающие среду с подходящей концентрацией меди в комбинации с подходящими уровнями аммония в супернатанте, для экспрессии высокомультимерных vWF с высокой удельной активностью.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к условиям культивирования клеток для получения рекombинантного высокомолекулярного vWF с высокой удельной активностью. Условия культивирования клеток согласно настоящему изобретению могут включать, например, среду для клеточной культуры с повышенной концентрацией меди и/или супернатант культуры клеток с низкой концентрацией аммония ( $\text{NH}_4^+$ ). Согласно настоящему изобретению также предложены способы культивирования клеток в условиях клеточной культуры для экспрессии высокомолекулярного vWF с высокой удельной активностью.

Согласно одному из аспектов настоящее изобретение обеспечивает раствор культуры клеток для получения высокомолекулярного рекombинантного белка vWF; указанный раствор культуры клеток содержит: среду для клеточной культуры, содержащую медь в концентрации по меньшей мере приблизительно 2,4 мкг/л; супернатант культуры клеток, содержащий аммоний в концентрации менее чем 10 mM; и множество клеток, экспрессирующих высокомультимерный белок vWF, причем указанный белок vWF обладает удельной ристоцетиновой активностью, составляющей по меньшей мере приблизительно 30 МЕ/мкг.

Согласно одному из конкретных вариантов реализации описанных выше культур клеток раствор культуры клеток содержит средовую добавку, содержащую медь.

Согласно одному из конкретных вариантов реализации описанных выше культур клеток указанная средовая добавка содержит гидролизат, необязательно - соевый гидролизат.

Согласно одному из конкретных вариантов реализации описанных выше культур клеток указанная

средовая добавка содержит соль меди, хелат меди или их комбинации.

Согласно одному из конкретных вариантов реализации описанных выше культур клеток указанная соль меди выбрана из группы, состоящей из сульфата меди, ацетата меди, карбоната меди, хлорида меди, гидроксида меди, нитрата меди и оксида меди.

Согласно одному из конкретных вариантов реализации описанных выше культур клеток концентрация меди составляет по меньшей мере приблизительно 4 мкг/л.

Согласно одному из конкретных вариантов реализации описанных выше культур клеток концентрация меди составляет от приблизительно 2,4 мкг/л до приблизительно 20 мкг/л.

Согласно одному из конкретных вариантов реализации описанных выше культур клеток белок vWF содержит от приблизительно 14 до приблизительно 22 димеров.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение обеспечивает способ получения высокомолекулярного рекомбинантного белка vWF; указанный способ включает этапы: а) обеспечения культуры клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный белок vWF; б) экспрессии белка vWF в указанных клетках в условиях клеточной культуры, включающих среду для клеточной культуры, содержащую медь в концентрации по меньшей мере приблизительно 2,4 мкг/л, и супернатант культуры клеток, содержащий аммоний в концентрации менее чем приблизительно 10 мМ, причем указанный белок vWF представляет собой высокомультимерный белок vWF и имеет удельную ристоцетиновую активность, составляющую по меньшей мере приблизительно 30 мЕ/мкг.

Согласно одному из конкретных вариантов реализации описанных выше способов указанные клетки представляют собой клетки млекопитающих.

Согласно одному из конкретных вариантов реализации описанных выше способов указанные клетки взяты из непрерывной клеточной линии.

Согласно одному из конкретных вариантов реализации описанных выше способов указанные клетки представляют собой клетки СНО.

Согласно одному из конкретных вариантов реализации описанных выше способов концентрация меди составляет по меньшей мере приблизительно 4 мкг/л.

Согласно одному из конкретных вариантов реализации описанных выше способов концентрация меди составляет от приблизительно от 2,4 мкг/л до приблизительно 20 мкг/л.

Согласно одному из конкретных вариантов реализации описанных выше способов рекомбинантный белок vWF обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью, составляющей по меньшей мере приблизительно 50 мЕ/мкг.

Согласно одному из конкретных вариантов реализации описанных выше способов рекомбинантный белок vWF обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью, составляющей от приблизительно 30 мЕ/мкг до приблизительно 100 мЕ/мкг.

Согласно одному из конкретных вариантов реализации описанных выше способов рекомбинантный белок vWF содержит приблизительно 14 до приблизительно 22 димеров.

Согласно одному из аспектов настоящее изобретение обеспечивает высокомолекулярный рекомбинантный белок vWF, получаемый при помощи процесса, включающего этапы: а) обеспечения культуры клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный белок vWF; и б) экспрессии белка vWF в указанных клетках в условиях клеточной культуры, включающих среду для клеточной культуры, содержащую медь в концентрации по меньшей мере 2,4 мкг/л, и супернатант культуры клеток, содержащий аммоний в концентрации менее чем 10 мМ, причем указанный белок vWF представляет собой высокомультимерный белок vWF и обладает удельной ристоцетиновой активностью, составляющей по меньшей мере приблизительно 30 мЕ/мкг.

Согласно одному из конкретных вариантов реализации вышеописанных композиций rVWF рекомбинантный белок vWF обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью, составляющей по меньшей мере приблизительно 50 мЕ/мкг.

Согласно одному из конкретных вариантов реализации вышеописанных композиций rVWF рекомбинантный белок vWF обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью, составляющей от приблизительно 30 мЕ/мкг до приблизительно 100 мЕ/мкг.

Согласно одному из конкретных вариантов реализации вышеописанных композиций rVWF рекомбинантный белок vWF содержит приблизительно от 14 до приблизительно 22 димеров.

Согласно одному из аспектов настоящее изобретение обеспечивает раствор культуры клеток для получения высокомолекулярного рекомбинантного белка vWF, при этом указанный раствор культуры клеток включает: среду для клеточной культуры, содержащую медь в концентрации по меньшей мере приблизительно 2,4 мкг/л; супернатант культуры клеток, содержащий аммоний в концентрации менее чем 10 мМ; и множество клеток, экспрессирующих высокомультимерный белок vWF, причем указанный белок vWF содержит от приблизительно 14 до приблизительно 22 димеров и обладает удельной ристоцетиновой активностью по меньшей мере приблизительно 30 мЕ/мкг.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к условиям культивирования клеток для получения рекомбинантного высокомолекулярного vWF, находящегося в высокомультимерной форме с высокой удельной активностью. Условия культивирования клеток согласно настоящему изобрете-

нию могут включать, например, среду для клеточной культуры с повышенной концентрацией меди и супернатант культуры клеток с низкой концентрацией аммония ( $\text{NH}_4^+$ ). Согласно настоящему изобретению также предложены способы культивирования клеток в условиях клеточной культуры для экспрессии высокомолекулярного vWF с высокой удельной активностью.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение включает раствор культуры клеток для получения высокомолекулярного рекомбинантного vWF, содержащего среду для клеточной культуры, содержащую медь в концентрации по меньшей мере приблизительно 2,4 мкг/л; супернатант культуры клеток, содержащий аммоний в концентрации менее чем 10 мМ; и множество клеток, экспрессирующих высокомультимерные vWF, содержащие от приблизительно 14 до приблизительно 22 димеров, и обладающие удельной ристоцетиновой активностью, составляющей по меньшей мере приблизительно 30 мЕ/мкг. Согласно одному из вариантов реализации описанных выше растворов культур клеток по меньшей мере 10% rVWF присутствует в виде высокомолекулярного VWF мультимера из более чем 10 димеров. Согласно конкретному варианту реализации по меньшей мере 15% rVWF присутствует в виде высокомолекулярного мультимера VWF из более чем 10 димеров. Согласно другому конкретному варианту реализации по меньшей мере 20% rVWF присутствует в виде высокомолекулярного мультимера VWF из более чем 10 димеров. Согласно другому конкретному варианту реализации по меньшей мере 25% rVWF присутствует в виде высокомолекулярного мультимера VWF из более чем 10 димеров. Согласно другому конкретному варианту реализации по меньшей мере 30% rVWF присутствует в виде высокомолекулярного мультимера VWF из более чем 10 димеров. Согласно определенным вариантам реализации концентрация меди может составлять по меньшей мере приблизительно 4 мкг/л, либо концентрация меди может варьировать от приблизительно 2,4 мкг/л до приблизительно 20 мкг/л. Согласно некоторым вариантам реализации среды для клеточных культур содержат средовую добавку, содержащую медь. Согласно определенным вариантам реализации указанная средовая добавка может содержать гидролизат или а соль меди, хелат меди или их комбинации. Согласно некоторым вариантам реализации указанная соль меди может включать сульфат меди, ацетат меди, карбонат меди, хлорид меди, гидроксид меди, нитрат меди или оксид меди. Согласно определенным вариантам реализации клетки могут быть взяты из непрерывной клеточной линии и могут включать клетки млекопитающих, такие как клетки CHO. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рекомбинантный vWF обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью, составляющей по меньшей мере приблизительно 50 мЕ/мкг, либо удельная ристоцетин-кофакторная активность может варьировать от приблизительно 30 мЕ/мкг до приблизительно 100 мЕ/мкг.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение включает способ получения высокомолекулярного рекомбинантного vWF, включающий: а) обеспечение культуры клеток; б) введение последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей vWF; в) отбор клеток, несущих указанную последовательность нуклеиновой кислоты; и, д) осуществление экспрессии vWF в указанных клетках в условиях клеточной культуры, включающих среду для клеточной культуры, содержащую медь в концентрации по меньшей мере приблизительно 2,4 мкг/л, и супернатант культуры клеток, содержащий аммоний в концентрации менее чем приблизительно 10 мМ, причем указанный vWF представляет собой высокомультимерный vWF, содержащий от приблизительно до приблизительно 22 димеров и обладающий удельной ристоцетиновой активностью по меньшей мере приблизительно 30 мЕ/мкг. Согласно одному варианту реализации супернатанта культуры клеток, описанной выше, по меньшей мере 10% rVWF присутствует в виде высокомолекулярного мультимера VWF из более чем 10 димеров. Согласно конкретному варианту реализации по меньшей мере 15% rVWF присутствует в виде высокомолекулярного мультимера VWF из более чем 10 димеров. Согласно другому конкретному варианту реализации по меньшей мере 20% rVWF присутствует в виде высокомолекулярного мультимера VWF из более чем 10 димеров. Согласно другому конкретному варианту реализации по меньшей мере 25% rVWF присутствует в виде высокомолекулярного мультимера VWF из более чем 10 димеров. Согласно другому конкретному варианту реализации по меньшей мере 30% rVWF присутствует в виде высокомолекулярного мультимера VWF из более чем 10 димеров. Согласно некоторым вариантам реализации клетки, которые могут быть взяты из непрерывной клеточной линии, могут включать клетки млекопитающих, такие как клетки CHO. Согласно определенным вариантам реализации концентрация меди может составлять по меньшей мере приблизительно 4 мкг/л, либо концентрация меди может варьировать от приблизительно 2,4 мкг/л до приблизительно 20 мкг/л. Согласно некоторым вариантам реализации среды для клеточных культур содержат средовую добавку, содержащую медь. Согласно определенным вариантам реализации указанная средовая добавка может содержать гидролизат или соль меди, хелат меди или их комбинации. Согласно некоторым вариантам реализации указанная соль меди может включать сульфат меди, ацетат меди, карбонат меди, хлорид меди, гидроксид меди, нитрат меди или оксид меди.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный рекомбинантный vWF обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью, составляющей по меньшей мере приблизительно 50 мЕ/мкг, либо удельная ристоцетин-кофакторная активность может варьировать от приблизительно 30 мЕ/мкг до приблизительно 100 мЕ/мкг.

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение охватывает высокомолекулярный рекомбинантный vWF, получаемый с помощью процесса, включающего этапы: а) обеспечения культуры клеток;

b) введения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей vWF; c) отбора клеток, несущих указанную последовательность нуклеиновой кислоты; и d) экспрессии vWF в указанных клетках в условиях клеточной культуры, включающих среду для клеточной культуры, содержащую медь в концентрации по меньшей мере 2,4 мкг/л, и супернатант культуры клеток, содержащий аммоний в концентрации менее чем 10 мМ, причем указанный vWF представляет собой высокомультимерный vWF, содержащий от приблизительно 14 до приблизительно 22 димеров и обладающий удельной ристоцетиновой активностью по меньшей мере приблизительно 30 мЕ/мкг. Согласно одному варианту реализации описанного выше супернатанта культуры клеток по меньшей мере 10% rVWF присутствует в виде высокомолекулярного мультимера VWF из более чем 10 димеров. Согласно конкретному варианту реализации по меньшей мере 15% rVWF присутствует в виде высокомолекулярного мультимера VWF из более чем 10 димеров. Согласно другому конкретному варианту реализации по меньшей мере 20% rVWF присутствует в виде высокомолекулярного мультимера VWF из более чем 10 димеров. Согласно другому конкретному варианту реализации по меньшей мере 25% rVWF присутствует в виде высокомолекулярного мультимера VWF из более чем 10 димеров. Согласно другому конкретному варианту реализации по меньшей мере 30% rVWF присутствует в виде высокомолекулярного мультимера VWF из более чем 10 димеров. Согласно некоторым вариантам реализации клетки могут быть из непрерывной клеточной линии и могут включать клетки млекопитающих, такие как клетки CHO. Согласно определенным вариантам реализации концентрация меди может составлять по меньшей мере приблизительно 4 мкг/л, либо концентрация меди может варьировать от приблизительно 2,4 мкг/л до приблизительно 20 мкг/л. Согласно некоторым вариантам реализации среды для клеточных культур содержат средовую добавку, содержащую медь. Согласно определенным вариантам реализации указанная средовая добавка может содержать гидролизат или соль меди, хелат меди или их комбинации. Согласно некоторым вариантам реализации указанная соль меди может включать сульфат меди, ацетат меди, карбонат меди, хлорид меди, гидроксид меди, нитрат меди или оксид меди. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рекомбинантный vWF обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью, составляющей по меньшей мере приблизительно 50 мЕ/мкг, либо указанная удельная ристоцетин-кофакторная активность может варьировать от приблизительно 30 мЕ/мкг до приблизительно 100 мЕ/мкг.

Согласно одному из аспектов в соответствии с настоящим изобретением предложена композиция, содержащая рекомбинантный фактор фон Виллебранда (rVWF), обладающий удельной ристоцетин-кофакторной активностью, составляющей по меньшей мере 30 мЕ/мкг. Согласно предпочтительному варианту реализации указанная композиция обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью, составляющей по меньшей мере 40 мЕ/мкг. Согласно более предпочтительному варианту реализации указанная композиция обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью, составляющей по меньшей мере 50 мЕ/мкг. Согласно более предпочтительному варианту реализации указанная композиция обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью, составляющей по меньшей мере 60 мЕ/мкг. Согласно более предпочтительному варианту реализации указанная композиция обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью, составляющей по меньшей мере 70 мЕ/мкг. Согласно еще более предпочтительному варианту реализации указанная композиция обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью, составляющей по меньшей мере 80 мЕ/мкг.

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций по меньшей мере 10% rVWF в указанной композиции присутствует в виде высокомолекулярного мультимера VWF из более чем 10 димеров. Согласно конкретному варианту реализации по меньшей мере 15% rVWF присутствует в виде высокомолекулярного мультимера VWF из более чем 10 димеров. Согласно другому конкретному варианту реализации по меньшей мере 20% rVWF присутствует в виде высокомолекулярного мультимера VWF из более чем 10 димеров. Согласно другому конкретному варианту реализации по меньшей мере 25% rVWF присутствует в виде высокомолекулярного мультимера VWF из более чем 10 димеров. Согласно другому конкретному варианту реализации по меньшей мере 30% rVWF присутствует в виде высокомолекулярного мультимера VWF из более чем 10 димеров.

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций указанная композиция содержит культуральный супернатант. Согласно одному из конкретных вариантов реализации указанный культуральный супернатант представляет собой супернатант культуры клеток млекопитающих. Согласно более конкретному варианту реализации указанный супернатант культуры клеток млекопитающих представляет собой супернатант клеток CHO.

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций, rVWF экспрессируется в культуре клеток, содержащей по меньшей мере 2,4 мкг/л меди. Согласно конкретному варианту реализации указанная культура клеток содержит по меньшей мере 4 мкг/л меди. Согласно более конкретному варианту реализации указанная культура клеток содержит от 2,4 до 20 мкг/л меди. Согласно одному из вариантов реализации медь представлена в виде соли меди, хелата меди или их комбинации. Согласно конкретному варианту реализации указанная соль меди выбрана из группы, состоящей из сульфата меди, ацетата меди, карбоната меди, хлорида меди, гидроксида меди, нитрата меди и оксида меди.

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций указанная культура клеток представляет собой периодическую культуру.

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций указанная культура клеток представляет собой непрерывную культуру. Согласно конкретному варианту реализации указанное непрерывное культивирование производится в хемотростическом режиме. Согласно другому конкретному варианту реализации указанное непрерывное культивирование производится в режиме перфузии.

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций уровень  $\text{NH}_4^+$  в указанной культуре поддерживают на уровне концентрации ниже 4 мМ.

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций плотность клеток в культуре поддерживают на уровне менее чем  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл.

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций плотность клеток в культуре поддерживают на уровне менее чем  $2,0 \times 10^6$  клеток/мл.

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций указанную культуру поддерживают на уровне менее чем  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл.

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций rVWF коэкспрессируется с рекомбинантным фактором VIII (rFVIII). Согласно конкретному варианту реализации большую часть коэкспрессируемого rFVIII удаляют. Согласно более конкретному варианту реализации отношение rVWF к rFVIII в указанной композиции составляет по меньшей мере 10:1.

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций указанную композицию получают в форме для фармацевтического введения. Согласно конкретному варианту реализации указанную композицию получают в форме для внутривенного, подкожного или внутримышечного введения.

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций указанную композицию лиофилизируют.

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение включает высокомолекулярный рекомбинантный vWF, получаемый с помощью процесса, включающего этапы: а) обеспечения культуры клеток; б) введения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей vWF; с) отбора клеток, несущих указанную последовательность нуклеиновой кислоты; и d) осуществление экспрессии vWF в указанных клетках в условиях клеточной культуры, включающих среду для клеточной культуры, содержащую медь в концентрации по меньшей мере 2,4 мкг/л, и супернатант культуры клеток, содержащий аммоний в концентрации менее чем 10 мМ, причем указанный vWF представляет собой высокомультимерный vWF, содержащий от приблизительно 14 до приблизительно 22 димеров и обладающий удельной ристоцетиновой активностью по меньшей мере приблизительно 30 мЕ/мкг. Очевидно, что здесь могут применяться все варианты реализации и концентрации, описанные в разделах "Среды для клеточных культур" и "Способы получения рекомбинантного vWF" выше.

Рекомбинантный vWF согласно настоящему изобретению может включать высокомолекулярный рекомбинантный белок vWF, обладающий высокой удельной активностью. Согласно одному из вариантов реализации vWF согласно настоящему изобретению представляет собой высокомультимерную форму vWF. Согласно некоторым вариантам реализации указанная высокомультимерная форма vWF содержит по меньшей мере до приблизительно 14 димеров, а согласно другим вариантам реализации - по меньшей мере до приблизительно 22 димера. Согласно другим вариантам реализации высокомультимерная форма vWF может варьировать от приблизительно 10 до приблизительно 20 димеров, или от приблизительно 15 до приблизительно 25 димеров, или от приблизительно 20 до приблизительно 40 димеров. Согласно определенным вариантам реализации рекомбинантный vWF сопоставим с vWF плазмы.

Согласно приведенному в настоящей заявке описанию в соответствии с настоящим изобретением получен неожиданный результат, состоящий в том, что повышенная концентрация меди в культуре клеток среды позволяет получать высокомолекулярный vWF с высокой удельной активностью. Среды для клеточных культур, содержащие медь в концентрации, например, выше, чем приблизительно 2,4 мкг/л, могут повышать выход рекомбинантного мультимерного vWF по сравнению с не содержащими медь средами. Согласно определенным вариантам реализации процент мультимерного vWF (т.е. rVWF, содержащего по меньшей мере 2 димера) может быть выше, чем приблизительно 50%, или выше, чем приблизительно 75%, или выше, чем приблизительно 90%. Уровень мультимеризации vWF может быть проанализирован с применением стандартных техник, таких как, например, in электрофорез в агарозе в невосстанавливающих условиях.

Согласно настоящей заявке рекомбинантный vWF, полученный при помощи способов согласно настоящему изобретению, может обладать высокой удельной активностью, например высокой удельной ристоцетин-кофакторной активностью. Согласно одному из вариантов реализации рекомбинантный vWF, полученный при помощи способов согласно настоящему изобретению, может обладать удельной ристоцетин-кофакторной активностью, составляющей по меньшей мере 30 мЕ/мкг, а согласно другому варианту реализации - по меньшей мере 50 мЕ/мкг. Согласно другим вариантам реализации удельная ристоцетин-кофакторная активность может варьировать от приблизительно 30 мЕ/мкг до приблизительно 100 мЕ/мкг или от приблизительно 50 мЕ/мкг до приблизительно 100 мЕ/мкг.

В. Рекомбинантный ADAMTS13 (rA13).

Белки ADAMTS (т.е. ADAMTS-1-ADAMTS-20) представляют собой семейство секретируемых цин-

ковых металлопротеиназ, имеющих общую модулярную доменную организацию (для ознакомления см. Flannery C.R., *Front Biosci.* 2006 Jan 1; 11:544-69). Все белки ADAMTS имеют общее строение центрального домена, состоящего из сигнального пептида, за которым следует продомен, цинк-зависимый металлопротеиназный каталитический домен, дезинтегрин-подобный домен, повтор тромбоспондина типа I, цистеин-богатый домен и спейсерный домен (Apte S.S., *J. Biol. Chem.* 2009 Nov 13;284(46):31493-7). Помимо этого, все они, кроме ADAMTS-4, содержат по меньшей мере еще один домен повтора тромбоспондина типа I, и многие из белков ADAMTS содержат один или более дополнительный вспомогательный домен. В частности, сообщалось, что все белки ADAMTS, по всей видимости, содержат по меньшей мере один кальций-связывающий сайт и по меньшей мере один цинк-связывающий сайт, расположенные внутри металлопротеиназного каталитического домена (Andreini et al., *J. Proteome Res.*, 2005, 4 (3), pp 881-888).

Описана биологическая роль белков ADAMTS при различных заболеваниях и состояниях, включая антиангиогенез, интерстициальный фиброз почек, перестройку костной ткани, фолликулогенез в яичниках, атеросклероз, развитие мочеполовой системы и рост/ремоделирование опухолей (ADAMTS-1); синдром Элерса-Данлоса типа 7C и бычий дерматоспараксис (ADAMTS-2); артрит, атеросклероз и тендинопатия (ADAMTS-4); артрит и глиобластома (ADAMTS-5); артрит (ADAMTS-7); антиангиогенез, злокачественные новообразования мозга, артрит и атеросклероз (ADAMTS-8); артрит (ADAMTS-9, -12); тромбоцитопеническая пурпура (ADAMTS-13); и антитромбоз/инсульт (ADAMTS 18) (для ознакомления см. Lin and Liu, *Open Access Rheumatology Research and Reviews* 2009:1 121-131).

Рекомбинантный ADAMTS13 (A13) экспрессировали в клетках млекопитающих и прежде, однако удельная активность широко варьирует в зависимости от условий культивирования клеток. Было обнаружено, что многие коммерчески доступные культуральные среды непригодны для экспрессии rA13 с высокой удельной активностью, выражаемой как отношение активности, измеренной посредством анализа FRETs-VWF73, к содержанию антигена, согласно оценке с применением ELISA. Согласно одному аспекту способы, предложенные согласно настоящему изобретению, основаны на нескольких полезных открытиях, позволяющих осуществлять экспрессию в культуре клеток белка rA13, обладающего повышенными уровнями общей и удельной активности.

Соответственно, благодаря общим структурно-функциональным связям семейства ADAMTS секретируемых металлопротеиназ, предлагаемые согласно настоящему изобретению способы позволяют экспрессировать в культуре клеток и выделять из клеточной среды все белки ADAMTS.

Согласно одному из аспектов в соответствии с настоящим изобретением предложена композиция, содержащая рекомбинантный ADAMTS13 (rA13), обладающий удельной FRETs-VWF активностью, составляющей по меньшей мере 1600 мЕ/мкг.

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций указанный rA13 обладает удельной FRETs-VWF активностью, составляющей по меньшей мере 800 мЕ/мкг.

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций указанная композиция содержит культуральный супернатант. Согласно конкретному варианту реализации указанный культуральный супернатант представляет собой супернатант культуры клеток млекопитающих. Согласно более конкретному варианту реализации указанный супернатант культуры клеток млекопитающих представляет собой супернатант клеток CHO.

Согласно одному варианту реализации вышеописанных композиций указанный rA13 экспрессируется в культуре клеток, содержащей по меньшей мере 1 мкг/л меди. Согласно конкретному варианту реализации указанная культура клеток содержит по меньшей мере 2 мкг/л меди. Согласно более конкретному варианту реализации указанная культура клеток содержит от 2 до 20 мкг/л меди.

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций медь представлена в виде соли меди, хелата меди или их комбинации. Согласно конкретному варианту реализации указанная соль меди выбрана из группы, состоящей из сульфата меди, ацетата меди, карбоната меди, хлорид меди, гидроксид меди, нитрата меди и оксида меди.

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций указанная культура клеток представляет собой периодическую культуру.

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций указанная культура клеток представляет собой непрерывную культуру. Согласно конкретному варианту реализации непрерывное культивирование производится в хеостатическом режиме. Согласно другому конкретному варианту реализации непрерывное культивирование производится в режиме перфузии.

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций уровень  $\text{NH}_4^+$  в указанной культуре поддерживают на уровне концентрации ниже 5 мМ.

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций уровень  $\text{NH}_4^+$  в указанной культуре поддерживают на уровне концентрации ниже 4 мМ.

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций плотность клеток в культуре поддерживают на уровне менее чем  $4,0 \times 10^6$  клеток/мл. Согласно конкретному варианту реализации плотность клеток в культуре поддерживают на уровне менее чем  $3,0 \times 10^6$  клеток/мл. Согласно конкрет-

ному варианту реализации плотность клеток в культуре поддерживают на уровне менее чем  $2,0 \times 10^6$  клеток/мл. Согласно более конкретному варианту реализации плотность клеток в культуре поддерживают на уровне менее чем  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл.

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций указанную композицию получают в форме для фармацевтического введения. Согласно конкретному варианту реализации указанную композицию получают в форме для внутривенного, подкожного или внутримышечного введения.

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций указанную композицию лиофилизируют.

#### V. Составы.

Согласно одному аспекту составы, содержащие рекомбинантные терапевтические белки гVWF или гA13 согласно настоящему изобретению, лиофилизируют перед введением. Лيوфилизация проводится с применением общеизвестных в данной области техники методик и должна быть оптимизирована для разрабатываемой композиции [Tang et al., Pharm. Res. 21:191-200, (2004) и Chang et al., Pharm. Res. 13:243-9 (1996)].

Способы получения фармацевтических составов может включать один или более следующий этап: добавление стабилизирующего агента согласно описанию в настоящей заявке к указанной смеси перед лиофилизацией, добавление по меньшей мере одного агента, выбранного из объемобразующего агента, регулирующего осмолярность агента и ПАВ, каждый из которых соответствует приведенному в настоящей заявке описанию, к указанной смеси перед лиофилизацией. Лيوфилизированный состав состоит, согласно одному аспекту, по меньшей мере из чего-либо одного или более из: буфера, объемобразующего агента и стабилизатора. Согласно этому аспекту оценивают полезность поверхностно-активного вещества и используют его в случаях, когда слипание на этапе процесса лиофилизации или восстановления представляет собой проблему. Для поддержания стабильности pH состава во время лиофилизации вводят подходящий буферизирующий агент.

Стандартный способ восстановления лиофилизированного материала заключается в повторном добавлении объема чистой воды или стерильной воды для инъекций (WFI) (как правило, эквивалентного объему, удаленному во время лиофилизации), хотя при получении фармацевтиков для парентерального введения иногда применяют разбавленные растворы антибактериальных агентов [Chen, Drug Development and Industrial Pharmacy, 18:1311-1354 (1992)]. Соответственно, предложены способы получения восстановленных композиций рекомбинантного VWF, включающие этап добавления разбавителя к лиофилизированной композиции рекомбинантного VWF согласно настоящему изобретению.

Леофилизированный материал может быть восстановлен в виде водного раствора. Различные водные носители, например стерильная вода для инъекций, вода с консервантами для многодозового применения или вода с подходящим количеством поверхностно-активных веществ (например, водная суспензия, которая содержит активное соединение в смеси с вспомогательными веществами, подходящими для получения водных суспензий). Согласно различным аспектам такие вспомогательные вещества представляют собой суспендирующие агенты, например, и без ограничения, карбоксиметилцеллюлозу натрия, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовую камедь и аравийскую камедь; диспергирующие или смачивающие агенты представляют собой встречающиеся в природе фосфатиды, например, и без ограничения, лецитин или продукты конденсации алкиленоксида с жирными кислотами, например, и без ограничения, полиоксиэтиленстеарат, или продукты конденсации этиленоксида с длинноцепочечными алифатическими спиртами, например, и без ограничения, гептадекаэтил-еноксицетанолом, или продукты конденсации этиленоксида с неполными эфирами, полученными из жирных кислот и гексита, такими как полиоксиэтиленсорбитмоноолеат, или продукты конденсации этиленоксида с неполными эфирами, полученными из жирных кислот и ангидридов гексита, например, и без ограничения, такими как полиэтиленсорбитанмоноолеат. Согласно различным аспектам указанные водные суспензии также содержат один или более консервант, например, и без ограничения, этил, или n-пропил, p-гидроксibenzoат.

Для введения композиций человеку или экспериментальным животным, согласно одному аспекту, указанные композиции содержат один или более фармацевтически приемлемый носитель. Выражения "фармацевтически" или "фармакологически" приемлемый относятся к молекулярным субстанциям и композициям, которые стабильны, подавляют разложение белков, например, агрегацию и продукты расщепления, и, кроме того, не вызывают аллергических или другие нежелательных реакций при введении с применением путей, общеизвестных в данной области техники, согласно приведенному ниже описанию. "Фармацевтически приемлемые носители" включают любые и все из клинически полезных растворителей, дисперсионных сред, покрытий, антибактериальных и противогрибковых агентов, изотонических и задерживающих абсорбцию агентов и т.п., включая агенты, описанные выше.

Указанные фармацевтические составы вводят внутривенно, перорально, местно, трансдермально, парентерально, путем ингаляции, вагинально, ректально или путем внутричерепной инъекции. Используемый в настоящей заявке термин "парентеральный" включает подкожные инъекции, внутривенные, внутримышечные, интраистернальные инъекции или инфузионные техники. Также включено введение

путем внутривенной, внутрикожной, внутримышечной, интрааммарной, внутрибрюшинной, интратекальной, ретробульбарной, внутрилегочной инъекции и/или хирургической имплантации в конкретный участок. Как правило, композиции по существу не содержат пирогенов, а также других примесей, которые могут быть вредными для реципиента.

Однократное или многократное введение указанных композиций выполняют с применением дозировок и схем, выбранных лечащим врачом. Подходящая для предотвращения или лечения заболевания дозировка зависит от типа заболевания, лечение которого проводят, тяжести и течения заболевания, от того, вводится ли лекарственное средство с профилактической или терапевтической целью, от предшествующей терапии, истории болезни пациента и реакции на лекарственное средство и на основании выбора лечащего врача.

Согласно одному аспекту составы согласно настоящему изобретению вводят сначала в виде болуса, а затем следует непрерывная инфузия для поддержания терапевтических циркулирующих уровней лекарственного продукта. В другом примере соединение согласно настоящему изобретению вводят в виде однократной дозы. Специалисты в данной области техники смогут легко оптимизировать эффективные дозировки и схемы введения в соответствии с надлежащей медицинской практикой и клиническим состоянием пациента. Частота введения доз зависит от фармакокинетических параметров агентов и пути введения. Оптимальный фармацевтический состав определяет специалист в данной области техники в зависимости от пути введения и требуемой дозировки. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042), стр. 1435-1712, включенные в настоящую заявку посредством ссылки. Такие составы влияют на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость клиренса *in vivo* введенных агентов. В зависимости от пути введения подходящую дозу вычисляют в соответствии с массой тела, площадью поверхности тела или размером органа. Подходящие дозировки могут быть уточнены посредством стандартных способов определения уровней дозы в крови в сочетании с подходящими данными о зависимости доза-эффект. Окончательный режим дозирования определяет лечащий врач с учетом различных факторов, модифицирующих действие лекарственных средств, например удельной активности лекарственного средства, тяжести поражения и отклика пациента, возраста, состояния, массы тела, пола и рациона питания пациента, тяжести любой инфекции, времени введения и других клинических факторов. Например, типичная доза рекомбинантного vWF согласно настоящему изобретению составляет приблизительно 50 Е/кг, что равно 500 мкг/кг. По мере проведения исследований появляется дополнительная информация относительно подходящих уровней дозировок и продолжительности лечения различных заболеваний и состояний.

#### VI. Способы лечения.

Настоящее изобретение также охватывает способы лечения пациента, нуждающегося в rVWF или rA13, полученных согласно способам, описанным в настоящей заявке. Такие способы лечения могут включать введение фармацевтических составов, содержащих рекомбинантный rA13 или высокомолекулярный рекомбинантный vWF согласно настоящему изобретению.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение обеспечивает способы терапевтического или профилактического лечения, включающие введение композиции rVWF или rA13, предложенной в настоящем изобретении. Как правило, для терапевтического применения составы вводят пациенту с заболеванием или состоянием, связанным с дисфункцией ADAMTS13 или VWF, или нуждающемуся в этом по иной причине, в "терапевтически эффективной дозе". Составы и количества, эффективные для указанного применения, зависят от тяжести указанного заболевания или состояния, и от общего состояния здоровья пациента. В зависимости от дозировки и частоты, требуемых и переносимых пациентом, может осуществляться однократное или многократное введение указанных составов.

Согласно одному из вариантов реализации в соответствии с настоящим изобретением предложены способы лечения или предотвращения заболеваний или состояний, связанных с дисфункцией ADAMTS13 или VWF. Согласно дальнейшему варианту реализации фармацевтические составы, содержащие рекомбинантный vWF, могут вводиться для лечения заболеваний, связанных с vWF, таких как болезнь Виллебранда или гемофилия. Согласно другому варианту реализации в соответствии с настоящим изобретением предложены способы лечения или предотвращения заболеваний или состояний, связанных с образованием и/или присутствием одного или более тромба, включающие введение композиции rA13, предложенной в настоящей заявке. Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение обеспечивает способы разрушения одного или более тромба у нуждающегося в этом пациента. Согласно другим вариантам реализации настоящее изобретение обеспечивает способы лечения или предотвращения инфаркта у нуждающегося в этом пациента. Как правило, предложенные в соответствии с настоящим изобретением способы включают введение композиции rADAMTS13 согласно настоящему изобретению нуждающемуся в этом пациенту.

Неограничивающими примерами расстройств, связанных с образованием и/или присутствием одного или более тромба, являются наследственная тромбоцитопеническая пурпура (ТТП), приобретенная ТТП, артериальный тромбоз, острый инфаркт миокарда (ОИМ), инсульт, сепсис и диссеминированное внутрисосудистое свертывание (ДВС).

Неограничивающие примеры расстройств, связанных с инфарктом, включают без ограничения ин-

фаркт миокарда (сердечный приступ), эмболию легких, цереброваскулярные нарушения, такие как инсульт, окклюзионная болезнь периферических артерий (например, гангрена), антифосфолипидный синдром, сепсис, гигантоклеточный артериит (ГКА), грыжа и заворот кишок.

#### VII. Примеры.

Изобретение будет также проиллюстрировано следующими примерами, не ограничиваясь ими.

##### Пример 1.

Эксперименты с непрерывной культурой клеток проводили с применением культуры рекомбинантной клеточной линии CHO, экспрессирующей vWF. Основная среда представляла собой DMEM/F12, содержащую приблизительно 0,3 мкг/л  $\text{Cu}^{2+}$ . В указанную среду был добавлен соевый гидролизат и сульфат меди ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) с получением конечной концентрации меди в среде выше, чем по меньшей мере 2,4 мкг/л.

Рекомбинантные клетки CHO, экспрессирующие vWF, культивировали в непрерывной клеточной культуре таким образом, что уровни аммония ( $\text{NH}_4^+$ ) находились на уровне концентрации менее чем приблизительно 10 мМ. Было обнаружено, что системы производства, обеспечивающие непрерывное поступление среды (например, перфузионные или хеMOSTатические культуры) предпочтительны, так как стандартные техники периодических или подпитываемых культур приводят к высоким концентрациям  $\text{NH}_4^+$  в конце культивирования. В конце культивирования выделяли высокомультимерный vWF и измеряли удельную ристоцетин-кофакторную активность vWF.

##### Пример 2.

Рекомбинантный фактор VIII (rFVIII) и фактор фон Виллебранда (rVWF) коэкспрессировали в периодических культурах клеток GD8/6 для определения эффекта состава культуральной среды на экспрессию и активность VWF. Вкратце, клетки GD8/6 культивировали в непрерывном режиме в среде BAV-SP, состоящей из порошка модифицированной основной среды DMEM/F12 (табл. 5) и дополнительных добавок, также содержащих 4 г/л соевого гидролизата, см. табл. 6, с добавлением или без добавления дополнительной меди. Для исследования эффекта низких концентраций меди на экспрессию и активность rVWF использовали основные BAV-SP среды. Указанные основные среды содержали 0,3 мкг/л меди и добавленный соевый гидролизат, что добавляло еще 0,7 мкг/л меди, как было установлено экспериментально, с получением конечной концентрации меди 1,0 мкг/л. Для сравнения в среды BAV-SP, используемые для периодических культур, также добавляли дополнительно 3,3 мкг/л  $\text{Cu}^{2+}$ , что давало конечную концентрацию меди 4,3 мкг/л, для определения действия высоких концентраций меди на экспрессию и активность VWF.

Таблица 5. Состав культуральных сред BAV-SP

|                                                                      |          |
|----------------------------------------------------------------------|----------|
| Среда BAV-SP                                                         |          |
| Компоненты                                                           | мг/л     |
| <b>Аминокислоты</b>                                                  |          |
| L-Аланин                                                             | 4,45     |
| L-Аргинин HCl                                                        | 147,50   |
| L-Аспарагин-H <sub>2</sub> O                                         | 30,21    |
| L-Аспарагиновая кислота                                              | 6,65     |
| L-Цистеин HCl-H <sub>2</sub> O                                       | 32,55    |
| L-Цистин 2HCl                                                        | 57,35    |
| L-Глутаминовая кислота                                               | 7,35     |
| Глицин                                                               | 18,75    |
| L-Гистидин-H <sub>2</sub> O HCl                                      | 31,48    |
| Гидрокси-L-Пролин                                                    |          |
| L-Изолейцин                                                          | 54,47    |
| L-Лейцин                                                             | 59,05    |
| L-Лизин HCl                                                          | 91,25    |
| L-Метионин                                                           | 17,24    |
| L-Фенилаланин                                                        | 35,48    |
| L-Пролин                                                             | 52,24    |
| L-Серин                                                              | 26,25    |
| L-Треонин                                                            | 53,45    |
| L-Триптофан                                                          | 29,01    |
| L-Тирозин 2Na 2H <sub>2</sub> O                                      | 55,79    |
| L-Валин                                                              | 52,85    |
| <b>Витамины</b>                                                      |          |
| Аскорбиновая кислота                                                 | 3,499    |
| Биотин                                                               | 0,0035   |
| Холинхлорид                                                          | 8,980    |
| D-Са-Пантотенат                                                      | 2,240    |
| Фолиевая кислота                                                     | 2,650    |
| I-Инозитол                                                           | 12,600   |
| Никотинамид                                                          | 2,020    |
| Пиридоксин HCl                                                       | 2,031    |
| Рибофлавин                                                           | 0,219    |
| Тиамин HCl                                                           | 2,170    |
| Витамин B12                                                          | 0,680    |
| <b>Неорганические соли</b>                                           |          |
| Кальция хлорид (CaCl <sub>2</sub> )                                  | 116,600  |
| Сульфат меди (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)                  | 0,0013   |
| Нитрат железа (Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O) | 0,050    |
| Сульфат железа (FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)                | 0,417    |
| Хлорид магния (MgCl <sub>2</sub> )                                   | 28,640   |
| Сульфат магния (MgSO <sub>4</sub> )                                  | 48,840   |
| Хлорид калия (KCl)                                                   | 311,800  |
| Хлорид натрия (NaCl)                                                 | 6995,500 |
| Фосфат натрия (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )                    | 71,020   |
| Фосфат натрия (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )                    | 62,500   |
| Гептагидрат сульфата цинка (ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)    | 0,432    |
| Селенит натрия                                                       | 0,0131   |
| <b>Другие</b>                                                        |          |
| D-Глюкоза                                                            | 3151     |
| Линолевая кислота                                                    | 0,042    |
| Липоевая кислота                                                     | 0,105    |
| Путресцин 2HCl                                                       | 0,081    |
| Тимидин                                                              | 0,365    |
| Гипоксантин Na                                                       | 2,390    |
| Пируват натрия                                                       | 55,000   |

Таблица 6. Состав добавки для BAV-SP

|                                         |          |
|-----------------------------------------|----------|
| <b>Компоненты конечного состава</b>     |          |
| L-Глутамин                              | 600,00   |
| Этаноламин                              | 1,530    |
| Supretonic F68                          | 250,000  |
| Бикарбонат натрия (NaHCO <sub>3</sub> ) | 2000,000 |
| Соевый пептон                           | 4000,00  |
|                                         |          |
| <b>Общий состав</b>                     | 18596,8  |

Клетки GD8/6, экспрессирующие rVWF, культивировали либо в среде с низким содержанием меди (табл. 7), либо в среде с высоким содержанием меди (табл. 8) в течение 7 дней. Через 2 дня культуры пересевали для проведения периодического культивирования на протяжении 5 дней. Образцы указанного культурального супернатанта ежедневно исследовали на содержание rVWF (vWF ELISA), общую (ристоцетин) и удельную (удельную активность) с применением ристоцетин-кофакторного анализа. Различные параметры культивирования, включая количество клеток, жизнеспособность клеток и концентрацию аммония также отслеживали ежедневно (кроме дней периодического культивирования 3 и 4).

Неожиданно было обнаружено, что культуры клеток, росшие при высоких концентрациях меди, давали супернатанты, имеющие значительно более высокую общую и удельную rVWF-активность (ср. результаты в табл. 7 и 8). Например, на 4-й день периодического культивирования культура клеток, росшая при высоких концентрациях меди, имела 1,52 ME rVWF активности/мл, по сравнению с 0,2 ME rVWF активности/мл для культуры с низким содержанием меди, несмотря на тот факт, что культура с низким содержанием меди клеток давала почти в два раза большее количество rVWF по сравнению с культурой клеток с высоким содержанием меди. Кроме того, удельная активность супернатанта, полученного из культуры с высоким содержанием меди, была более чем в 13 раз выше, чем у супернатанта культуры с низким содержанием меди (831 мЕ/10 мкг rVWF к 62 мЕ/10 мкг rVWF).

Как видно из табл. 7 и 8, общая и удельная ристоцетин-кофакторная активность культуры с высоким содержанием меди была в два раза выше таковой культуры с низким содержанием меди, на 1-й день периодического культивирования. Кроме того, в отличие от последующего увеличения активности, наблюдаемого в культуре с высоким содержанием меди, в культуре клеток с низким содержанием меди не было отмечено увеличения ристоцетин-кофакторной активности после 1-го дня периодического культивирования. В соответствии с этим результатом анализ мультимерного статуса rVWF электрофорезом в агарозном геле показал, что в супернатанте культуры клеток с низким содержанием меди в 1-й день периодического культивирования присутствовала низкая относительно концентрации низкомолекулярных видов rVWF концентрация высокомолекулярного rVWF и также что указанная относительная концентрация снижалась с течением времени (фиг. 1А и 1В). Напротив, добавление в культуральную среду  $\text{Cu}^{2+}$  стабильно приводило к образованию антигена с ристоцетин-кофакторной (RiCoF) активностью на протяжении четвертого дня. В соответствии с этим уменьшения количества стабильных высокомолекулярных мультимеров rVWF в течение дня 4 периодической культуры не происходило (фиг. 1А и 1В). Результаты денситометрии агарозного электрофоретического геля, приведенные на фиг. 1В, показали, что при условии низкого уровня меди культура способна продуцировать только популяцию rVWF, более чем 10% rVWF которой (т.е. 16,3%) представлено молекулами из более чем 10 димеров, в течение одного дня периодического культивирования (т.е. образец "дня 3" в 2 полосе агарозного геля на фиг. 1 А); примечательно, что эта популяция опускалась до всего лишь 4% на день 5 периодического культивирования (образец "дня 7" в полосе 6). Напротив, в условиях высокого содержания меди относительное количество мультимеров VWF, состоящих из более чем 10 димеров, стабильно составляет около 30% на протяжении дня 4 в периодической культуре ("день 3"-"день 6" в полосах 7-10; 28-31,4%).

Примечательно, что, начиная с 5-го дня периодического культивирования культуры с высоким содержанием меди, когда уровни  $\text{NH}_4^+$  превышали 100 мг/л (выше, чем приблизительно 5,0 мМ), экспрессия дополнительного антигена (18,3-35,4 мкг/л; ср. дни периодического культивирования 4 и 5 в табл. 8) не приводила к сопутствующему увеличению RiCoF-активности в супернатанте. В соответствии с этим результатом уровень высокомолекулярных мультимеров rVWF на 5-й день периодического культивирования (7-й день культивирования) снижался относительно концентрации низкомолекулярных мультимеров rVWF. Также только на 5-й день периодического культивирования (образец "дня 7" культуры в полосе 11) относительное количество vWF, состоящего из более чем 10 димеров, снижается до 21,4%.

В совокупности приведенные выше данные показывают, что дополнительная концентрация меди в культурах клеток, экспрессирующих rVWF, существенно увеличивает общую и удельную ристоцетин-кофакторную активность rVWF, а также стабильную выработку высокомолекулярных мультимеров rVWF. Кроме того, эти данные выявляют корреляцию между высокими концентрациями  $\text{NH}_4^+$  в культуре клеток и снижением ристоцетин-кофакторной активности rVWF и выработки высокомолекулярного мультимерного rVWF.

Таблица 7. Экспрессия rVWF в культурах клеток млекопитающих при периодическом режиме культивирования с применением сред BAV-SP с низкой концентрацией меди (1,0 мкг/л)

| день периодического культивирования | Количество клеток [10E6 клеток/мл] | $\text{NH}_4^+$ [мг/л] | Жизнеспособность [%] | vWF ELISA [мкг/мл] | Ристоцетин [МЕ/мл] | Удельная активность МЕ/10мкг |
|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------|----------------------|--------------------|--------------------|------------------------------|
| 0                                   | 0,42                               | 21                     | 98,8                 | н.о.               | н.о.               | н.о.                         |
| 1                                   | 0,78                               | 43                     | н.о.                 | 6,3                | 0,23               | 365                          |
| 2                                   | 1,24                               | 64                     | 99,1                 | 12,8               | 0,23               | 180                          |
| 3                                   | 1,86                               | н.о.                   | н.о.                 | 22,7               | 0,21               | 93                           |
| 4                                   | 2,49                               | н.о.                   | н.о.                 | 32,2               | 0,20               | 62                           |
| 5                                   | 3,11                               | 106                    | 98,3                 | 44,4               | 0,20               | 45                           |

Таблица 8. Экспрессия гVWF в культурах клеток млекопитающих, культивируемых в периодическом режиме с применением BAV-SP сред с высокой концентрацией меди (4,3 мкг/л)

| день<br>периодического<br>культивирования | Количество<br>клеток<br>[10Е6<br>клеток/мл] | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup><br>[мг/л] | Жизнеспособность<br>[%] | vWF<br>ELISA<br>[мкг/мл] | Ристоцетин<br>[МЕ/мл] | Удельная<br>активность<br>МЕ/10мкг |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| 0                                         | 0,40                                        | 21                                     | 99,3                    | н.о.                     | н.о.                  | н.о.                               |
| 1                                         | 0,71                                        | 42                                     | н.о.                    | 4,8                      | 0,40                  | 833                                |
| 2                                         | 1,23                                        | 63                                     | 99,5                    | 8,7                      | 0,62                  | 713                                |
| 3                                         | 1,85                                        | н.о.                                   | н.о.                    | 15,0                     | 1,07                  | 713                                |
| 4                                         | 2,54                                        | н.о.                                   | н.о.                    | 18,3                     | 1,52                  | 831                                |
| 5                                         | 3,32                                        | 109                                    | 98,9                    | 35,4                     | 1,55                  | 438                                |

Пример 3.

Рекомбинантный фактор VIII (гFVIII) и фактор фон Виллебранда (гVWF) коэкспрессировали в непрерывных культурах клеток GD8/6, эксплуатируемых в хемотростических условиях, для определения эффекта состава культуральной среды на экспрессию и активность VWF. Вкратце, клетки GD8/6 культивировали в среде BAV-SP, содержащей 4 г/л соевого гидролизата с добавлением и без добавления меди согласно описанию в примере 2. Для исследования эффекта низких концентраций меди на экспрессию и активность гVWF применяли основные среды BAV-SP. Указанные основные среды содержали 0,3 мкг/л меди и добавленный соевый гидролизат, что давало дополнительные 0,7 мкг/л меди с получением конечной концентрации меди 1,0 мкг/л. Для сравнения в периодических культурах применяли среды BAV-SP также с добавлением дополнительных 3,3 мкг/л Cu<sup>2+</sup>, с получением конечной концентрации меди 4,3 мкг/л, для определения эффекта высоких концентраций меди на экспрессию и активность VWF. Культуры, растущие в присутствии высоких и низких концентраций меди, культивировали как при высокой (2,8×10<sup>6</sup> клеток/мл), так и при низкой (прибл. 1,4×10<sup>6</sup> клеток/мл) плотности клеток.

Как и ранее, образцы указанного культурального супернатанта исследовали на гVWF содержание (vWF ELISA), общую (ристоцетиновую) и удельную (удельную активность) активность посредством ристоцетин-кофакторного анализа. Также отслеживали различные параметры культуры, включая количество клеток, жизнеспособность клеток и концентрацию аммония. Данные получали на основании фазы стационарного состояния недель 2 и 3 хемотростической культуры (табл. 9-13).

Таблица 9. Средние данные по экспрессии гVWF в хемотростической культуре клеток на протяжении недель 2 и 3

| Количество<br>клеток | Концентрация<br>меди | Количество<br>клеток<br>[10Е6<br>клеток/мл] | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup><br>[мМ] | Жизнеспособность<br>[%] | vWF<br>ELISA<br>[мкг/мл] | Ристоцетин<br>[МЕ/мл] | удельная<br>активность<br>[МЕ/10мкг] |
|----------------------|----------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| большое              | низкая               | 2,88                                        | 3,88                                 | 97,74                   | 44,56                    | 0,10                  | 21,62                                |
| большое              | высокая              | 2,79                                        | 4,04                                 | 98,25                   | 38,38                    | 0,19                  | 53,11                                |
| маленькое            | низкая               | 1,55                                        | 3,33                                 | 98,63                   | 18,96                    | 0,10                  | 50,16                                |
| маленькое            | высокая              | 1,43                                        | 3,17                                 | 98,59                   | 11,76                    | 0,70                  | 598,76                               |

Таблица 10. Экспрессия гVWF в хемотростической культуре клеток в условиях большого количества клеток и низкого уровня меди на протяжении недель 2 и 3

| День | Количество<br>клеток<br>[10Е6<br>клеток/мл] | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup><br>[мМ] | Жизнеспособность<br>[%] | vWF<br>ELISA<br>[мкг/мл] | Ристоцетин<br>[МЕ/мл] | удельная<br>активность<br>[МЕ/10мкг] |
|------|---------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| 8    | 2,54                                        | 3,7                                  | 98,20                   | 39,8                     | 0,095                 | 23,86934673                          |
| 9    | 3,02                                        | 4,2                                  | 97,40                   |                          |                       |                                      |
| 10   | 2,97                                        | 3,9                                  | 97,90                   | 41,3                     | 0,095                 | 23,00242131                          |
| 11   | 2,78                                        |                                      |                         |                          |                       |                                      |
| 13   | 2,91                                        | 3,8                                  | 97,60                   | 41,7                     | 0,095                 | 22,78177458                          |
| 14   | 2,90                                        | 3,8                                  | 97,40                   |                          |                       |                                      |
| 15   | 3,05                                        | 3,9                                  | 97,70                   | 44,7                     | 0,095                 | 21,25279642                          |
| 16   | 2,99                                        | 3,8                                  | 98,30                   |                          |                       |                                      |
| 17   | 2,76                                        | 3,9                                  | 97,40                   | 55,3                     | 0,095                 | 17,17902351                          |
|      | 2,88                                        | 3,88                                 | 97,74                   | 44,56                    | 0,10                  | 21,62                                |

Таблица 11. Экспрессия rVWF в хеостатической культуре клеток в условиях большого количества клеток и высоких уровней меди на протяжении недель 2 и 3

| День | Количество клеток [10E6 клеток/мл] | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> [мМ] | Жизнеспособность [%] | vWF ELISA [мкг/мл] | Ристоцетин [МЕ/мл] | удельная активность [мЕ/10мкг] |
|------|------------------------------------|-----------------------------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------------------|
| 8    | 2,52                               | 3,9                               | 98,30                | 31,8               | 0,35               | 110,0628931                    |
| 9    | 2,92                               | 4,3                               | 98,50                |                    |                    |                                |
| 10   | 2,80                               | 4,2                               | 98,60                | 37,4               | 0,32               | 85,56149733                    |
| 11   | 2,57                               |                                   |                      |                    |                    |                                |
| 13   | 2,81                               | 3,9                               | 98,50                | 37,6               | 0,095              | 25,26595745                    |
| 14   | 2,92                               | 3,9                               | 97,80                |                    |                    |                                |
| 15   | 2,77                               | 3,9                               | 97,80                | 43,0               | 0,095              | 22,09302326                    |
| 16   | 2,72                               | 4,0                               | 98,30                |                    |                    |                                |
| 17   | 3,04                               | 4,1                               | 98,20                | 42,1               | 0,095              | 22,56532067                    |
|      | <b>2,79</b>                        | <b>4,04</b>                       | <b>98,25</b>         | <b>38,38</b>       | <b>0,19</b>        | <b>53,11</b>                   |

Таблица 12. Экспрессия rVWF в хеостатической культуре клеток в условиях маленького количества клеток, низкого уровня меди на протяжении недель 2 и 3

| День | Количество клеток [10E6 клеток/мл] | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> [мМ] | Жизнеспособность [%] | vWF ELISA [мкг/мл] | Ристоцетин [МЕ/мл] | удельная активность [мЕ/10мкг] |
|------|------------------------------------|-----------------------------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------------------|
| 8    | 1,61                               | 3,3                               | 99,10                | 19,3               | 0,095              | 49,22279793                    |
| 9    | 1,65                               | 3,3                               | 98,00                |                    |                    |                                |
| 10   | 1,49                               | 3,3                               | 98,90                | 18,6               | 0,095              | 51,07526882                    |
| 11   | 1,58                               |                                   |                      |                    |                    |                                |
| 13   | 1,58                               | 3,4                               | 98,10                | 18,1               | 0,095              | 52,48618785                    |
| 14   | 1,56                               | 3,3                               | 99,30                |                    |                    |                                |
| 15   | 1,52                               | 3,3                               | 98,50                | 18,9               | 0,095              | 50,26455026                    |
| 16   | 1,50                               | 3,3                               | 98,40                |                    |                    |                                |
| 17   | 1,50                               | 3,4                               | 98,70                | 19,9               | 0,095              | 47,73869347                    |
|      | <b>1,55</b>                        | <b>3,33</b>                       | <b>98,63</b>         | <b>18,96</b>       | <b>0,10</b>        | <b>50,16</b>                   |

Таблица 13. Экспрессия rVWF в хеостатической культуре клеток в условиях маленького количества клеток, высокого уровня меди на протяжении недель 2 и 3

| День | Количество клеток [10E6 клеток/мл] | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> [мМ] | Жизнеспособность [%] | vWF ELISA [мкг/мл] | Ристоцетин [МЕ/мл] | удельная активность [мЕ/10мкг] |
|------|------------------------------------|-----------------------------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------------------|
| 8    | 1,46                               | 3,2                               | 98,80                | 11,6               | 0,73               | 629,3103448                    |
| 9    | 1,45                               | 3,2                               | 98,20                |                    |                    |                                |
| 10   | 1,37                               | 3,1                               | 98,90                | 11,0               | 0,7                | 636,3636364                    |
| 11   | 1,43                               |                                   |                      |                    |                    |                                |
| 13   | 1,33                               | 3,2                               | 98,10                | 11,1               | 0,68               | 612,6126126                    |
| 14   | 1,39                               | 3,2                               | 97,20                |                    |                    |                                |
| 15   | 1,51                               | 3,2                               | 99,70                | 12,4               | 0,69               | 556,4516129                    |
| 16   | 1,49                               | 3,2                               | 98,60                |                    |                    |                                |
| 17   | 1,43                               | 3,2                               | 99,20                | 12,7               | 0,71               | 559,0551181                    |
|      | <b>1,43</b>                        | <b>3,17</b>                       | <b>98,59</b>         | <b>11,76</b>       | <b>0,70</b>        | <b>598,76</b>                  |

Как показано на фиг. 2А, супернатант, собранный из непрерывной rVWF-культуры клеток, выращенной при низкой плотности клеток и высоких концентрациях меди, имел высокую удельную активность (в среднем 600 мЕ/10 мкг), в то время как супернатанты, собранные из rVWF-культур клеток, выращенных при высокой плотности клеток в присутствии высоких или низких концентраций меди, и rVWF-культур клеток, выращенных при низкой плотности клеток в присутствии низкой концентрации меди, имели низкие удельные активности (менее чем 100 мЕ/10 мкг). В соответствии с результатами, полученными для периодических культур, как видно из фиг. 2В, непрерывные культуры клеток млекопитающих, экспрессирующие rVWF с высокой удельной активностью, содержат более низкие NH<sub>4</sub><sup>+</sup> концентрации, чем культуры, продуцирующие rVWF с низкой удельной активностью. Эти данные также подтверждают корреляцию между концентрацией NH<sub>4</sub><sup>+</sup> в культуре клеток и удельной активностью rVWF, продуцируемого указанной культурой. Примечательно, что комбинация высокой концентрации меди и низкой концентрации аммония в культуре клеток позволяла добиться значительного повышения активности rVWF.

В соответствии с этим результатом анализ мультимерного статуса rVWF в хеостатических культурах с помощью электрофореза в агарозном геле (фиг. 6) показал, что только супернатанты культур, эксплугируемых при высоком содержании меди и низкой плотности клеток и, таким образом, низком содержании аммония, обеспечивали устойчивую экспрессию высокомультимерного vWF (приблизительно

23-27% в дни CST 8, 17 и 24, полосы 4, 8, и 12 соответственно). Все прочие условия не обеспечивали устойчивого достижения большого количества - более чем 10% vWF, содержащего более чем 10 димеров, на протяжении длительного периода культивирования.

Пример 4.

Для определения эффекта концентрации меди в культуральной среде на экспрессию и удельную активность гA13 культуры клеток млекопитающих для экспрессии гA13 культивировали в течение 4 недель в условиях хемотростической непрерывной культуры в среде ADAMTS13, включающей модифицированные основные среды DMEM/F12 BESP845 и дополнительные добавки (табл. 14), содержащие медь в диапазоне концентраций от 0,66 мкг/л (без дополнительного добавления меди) и с дополнительным добавлением меди до 4 мкг/л. Как видно из табл. 15, возрастающая концентрация меди в среде для клеточных культур приводила к значительному увеличению объемной (P) и удельной (q) продуктивности, выражаемой в виде общей активности гA13, полученного на литр культуры в день, и общей активности полученного гA13 на клетку в день, соответственно.

Таблица 14. Состав среды для получения ADAMTS13

| <b>DMEM/F12 BESP845</b>         |             |
|---------------------------------|-------------|
| <b>Аминокислоты</b>             | <b>мг/л</b> |
| L-Аланин                        | 13,3500     |
| L-Аргинин HCl                   | 147,5000    |
| L-Аспарагин-H <sub>2</sub> O    | 45,1600     |
| L-Аспарагиновая кислота         | 19,9500     |
| L-Цистеин HCl-H <sub>2</sub> O  | 32,5500     |
| L-Цистин 2HCl                   | 102,3500    |
| L-Глутаминовая кислота          | 22,0500     |
| Глицин                          | 26,2500     |
| L-Гистидин-H <sub>2</sub> O HCl | 51,4800     |
| L-Изолейцин                     | 74,4700     |
| L-Лейцин                        | 119,0500    |
| L-Лизин HCl                     | 146,2500    |
| L-Метионин                      | 100,0000    |
| L-Фенилаланин                   | 60,4800     |
| L-Пролин                        | 63,7400     |
| L-Серин                         | 36,7500     |
| L-Треонин                       | 53,4500     |
| L-Триптофан                     | 29,0100     |
| L-Тирозин 2Na 2H <sub>2</sub> O | 75,7900     |
| L-Валин                         | 82,8500     |

| <b>соли</b>                                                              | <b>мг/л</b>    |
|--------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Кальция хлорид ( $\text{CaCl}_2$ )                                       | 116,6000       |
| Сульфат меди ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )               | 0,0026         |
| Нитрат железа ( $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ )   | 0,0500         |
| Сульфат железа ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )             | 1,0170         |
| Хлорид магния ( $\text{MgCl}_2$ )                                        | 28,6400        |
| Сульфат магния ( $\text{MgSO}_4$ )                                       | 48,8400        |
| Хлорид калия ( $\text{KCl}$ )                                            | 311,8000       |
| Хлорид натрия ( $\text{NaCl}$ )                                          | 5495,5000      |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ Безводный                                      | 213,0200       |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ Безводный                                      | 54,3500        |
| Гептагидрат сульфата цинка ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) | 0,4320         |
| Селенит натрия, безводный                                                | 0,0087         |
| <b>Витамины</b>                                                          | <b>мг/л</b>    |
| Аскорбиновая кислота                                                     | 3,4990         |
| Биотин                                                                   | 0,2035         |
| Холинхлорид                                                              | 26,9800        |
| D-Са-Пантотенат                                                          | 6,2400         |
| Фолиевая кислота                                                         | 6,6500         |
| I-Инозитол                                                               | 36,6000        |
| Никотинамид                                                              | 7,0200         |
| Пиридоксин HCl                                                           | 6,0310         |
| Рибофлавин                                                               | 0,6590         |
| Тиамин HCl                                                               | 6,5100         |
| Витамин B12                                                              | 2,6800         |
| <b>другое</b>                                                            | <b>мг/л</b>    |
| D-Глюкоза                                                                | 5000,0000      |
| Линолевая кислота                                                        | 0,0420         |
| Липоевая кислота                                                         | 1,0050         |
| Путресцин 2HCl                                                           | 3,6810         |
| Тимидин                                                                  | 0,3650         |
| Гипоксантин Na                                                           | 2,3900         |
| Пируват натрия                                                           | 55,0000        |
| <b>DMEM/F12 BESP845: всего</b>                                           | <b>12738,3</b> |
| <b>ADAMTS-13 Средовые добавки</b>                                        | <b>мг/л</b>    |
| L-Глутамин                                                               | 1300,0000      |
| Pluronic F68                                                             | 1000,0000      |
| Этаноламин                                                               | 1,5300         |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$                                | 1,0000         |
| Na-Гидрокарбонат                                                         | 1500,0000      |
| <b>Всего добавок</b>                                                     | <b>3802,5</b>  |
| <b>Общее количество ингредиентов</b>                                     | <b>16540,8</b> |

Чтобы определить, влияют ли повышенные концентрации меди на сохранность экспрессируемого гA13, супернатант, собранный от гA13-культур клеток, выращенных в среде, содержащей 0,66 мкг/л, 1 и 4 мкг/л меди, исследовали с помощью анализа ДСН-ПААГ. Как видно из фиг. 3А (окрашивание серебром) и фиг. 3В (анти-A13 вестерн-блоттинг), очевидных изменений в качестве продукта при геле-электрофорезе не наблюдается. Так, экспрессия гA13 в присутствии повышенных концентраций меди не приводит к повышению уровня усеченного 170 кДа или других низкомолекулярных вариантов гA13, и к появлению дополнительных или увеличению полос, соответствующих НСР(белкам клеток-хозяев).

При расчете оптимальной концентрации меди для активности гA13 экстраполирование данных из табл. 15 о зависимости Р Frets от концентрации меди (фиг. 4) показывает, что оптимальный эффект, очевидно, достигается при приблизительно 2 мкг/л, с негативным влиянием по консервативной оценке при более чем приблизительно 4 мкг/л.

Таблица 15. Экспрессия гA13 в культурах клеток млекопитающих при хемотростическом режиме непрерывного культивирования с применением среды, содержащей различные концентрации меди

| Объем 10 л<br>R&D (НИР)<br>эксперимент<br>Среднее за 4 недели CST | ZZ – NC             | P Frets   | q Frets                 | Уд.<br>активность |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------|-----------|-------------------------|-------------------|
|                                                                   | [10E6<br>клеток/мл] | [E/(л*д)] | [E/(10E9 клетки*<br>д)] | Е/мг              |
| 0,66 мкг/л Cu <sup>2+</sup>                                       | 1,35                | 1322      | 1028                    | 1759              |
| 1 мкг/л Cu <sup>2+</sup>                                          | 1,64                | 1962      | 1247                    | 1690              |
| 4 мкг/л Cu <sup>2+</sup>                                          | 2,26                | 2960      | 1338                    | 1768              |

На основании полученных результатов, описанных выше, был проведен дополнительный эксперимент для сравнения экспрессии гA13 в среде для клеточных культур, содержащей 0,66 мкг/л меди и содержащих 2,0 мкг/л меди. Как видно из табл. 16, добавление в основные клеточные среды меди до конечной концентрации 2,0 мкг/л меди приводило к значительному повышению объемной (P) и удельной (q) продуктивности, выраженной в виде общей активности гA13, полученного на литр культуры в день и общей активности гA13, полученного на клетку в день, соответственно, на протяжении 8 недель. Конкретные данные для каждой недели выработки гA13 в двух указанных культурах приведены на фиг. 5. Из этих данных очевидно следует, что добавление меди оказывает измеряемый благоприятный эффект на метаболизм клеток, удельную скорость роста и выработку гA13.

Таблица 16. Экспрессия гA13 в культурах клеток млекопитающих при хемотростическом режиме непрерывного культивирования с применением среды, содержащей различные концентрации меди

| Объем 10 л<br>Среднее за 8 недель CST | ZZ – NC       | P Frets   | q Frets          | Уд. активность |
|---------------------------------------|---------------|-----------|------------------|----------------|
|                                       | [10E6 кл./мл] | [E/(л*д)] | [E/(10E9 кл.*д)] | Е/мг           |
| 0,66 мкг/л Cu <sup>2+</sup>           | 1,29          | 1049      | 821              | 1862           |
| 2 мкг/л Cu <sup>2+</sup>              | 2,17          | 2470      | 1146             | 1749           |

Понятно, что примеры и варианты реализации, описанные в настоящей заявке, приведены исключительно для наглядности и что различные модификации или изменения с учетом таковых будут понятны специалистам в данной области техники, подлежат включению в суть и объем настоящей заявки и подпадают под действие прилагаемой формулы изобретения. Все упоминаемые в настоящей заявке публикации, патенты и патентные заявки включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте для любых целей.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения культуральной жидкости клеток млекопитающего, содержащей высокомолекулярный рекомбинантный фактор фон Виллебранда (гVWF), отличающийся тем, что указанный способ включает этапы:

- обеспечения основной среды для культивирования клеток;
- добавления в указанную основную среду соли меди до конечной концентрации меди от 2,4 до 20 мкг/л;
- обеспечения клеток млекопитающего, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую гVWF;
- непрерывного культивирования указанных клеток в среде, полученной на этапе b), в результате чего происходит экспрессия и секретирование гVWF указанными клетками в культуральную жидкость, причем концентрацию NH<sub>4</sub><sup>+</sup> в указанной культуральной жидкости поддерживают на уровне ниже 4 мМ, а плотность клеток поддерживают на уровне менее чем 2,5×10<sup>6</sup> клеток/мл на протяжении всего этапа культивирования; и
- выделения по меньшей мере части указанной культуральной жидкости клеток, причем указанная выделенная культуральная жидкость клеток имеет удельную ристоцетин-кофакторную активность гVWF, составляющую по меньшей мере 30 мЕ/мкг гVWF.

2. Способ по п.1, дополнительно включающий добавление растительного гидролизата в основную среду на этапе а).

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что указанный гидролизат представляет собой соевый гидролизат.

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанная основная среда представляет со-

бой не содержащую животных белков культуральную среду.

5. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанная основная среда представляет собой не содержащую белков культуральную среду.

6. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанная основная среда представляет собой культуральную среду с заданным химическим составом.

7. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что конечная концентрация меди в основной среде составляет по меньшей мере 4 мкг/л.

8. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что конечная концентрация меди в основной среде составляет от 2,4 до 6 мкг/л меди.

9. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что клетки млекопитающего представляют собой клетки СНО.

10. Способ по п.1, отличающийся тем, что непрерывное культивирование клеток осуществляют в хемотатическом режиме или в режиме перфузии.

11. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что клетки культивируют по меньшей мере в 100 л среды, полученной на этапе b).

12. Способ по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что плотность клеток поддерживают на уровне не менее чем  $2,0 \times 10^6$  клеток/мл на протяжении всего этапа культивирования.

13. Способ по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что плотность клеток поддерживают на уровне не менее чем  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл на протяжении всего этапа культивирования.

14. Способ по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что отделенная культуральная жидкость имеет удельную ристоцетин-кофакторную активность rVWF, составляющую по меньшей мере 40 мЕ/мкг rVWF.

15. Способ по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что отделенная культуральная жидкость имеет удельную ристоцетин-кофакторную активность rVWF, составляющую по меньшей мере 50 мЕ/мкг rVWF.

16. Способ по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что отделенная культуральная жидкость имеет удельную ристоцетин-кофакторную активность rVWF, составляющую по меньшей мере 60 мЕ/мкг rVWF.

17. Способ по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что отделенная культуральная жидкость имеет удельную ристоцетин-кофакторную активность rVWF, составляющую по меньшей мере 70 мЕ/мкг rVWF.

18. Способ по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что отделенная культуральная жидкость имеет удельную ристоцетин-кофакторную активность rVWF, составляющую по меньшей мере 80 мЕ/мкг rVWF.

19. Способ по любому из пп.1-14, отличающийся тем, что культуральная жидкость содержит по меньшей мере 30% высокомолекулярных мультимеров VWF, состоящих более чем из 10 димеров, или содержит высокомолекулярные мультимеры VWF, состоящие из 14-22 димеров.

20. Способ по любому из пп.1-19, отличающийся тем, что rVWF соэкспрессируется с рекомбинантным фактором VIII (rFVIII).

21. Способ по п.20, дополнительно включающий этап очистки rVWF по меньшей мере от 50% rFVIII, присутствующего в отделенной культуральной жидкости.

22. Способ по п.21, отличающийся тем, что отношение rVWF к rFVIII после очистки составляет по меньшей мере 10:1.

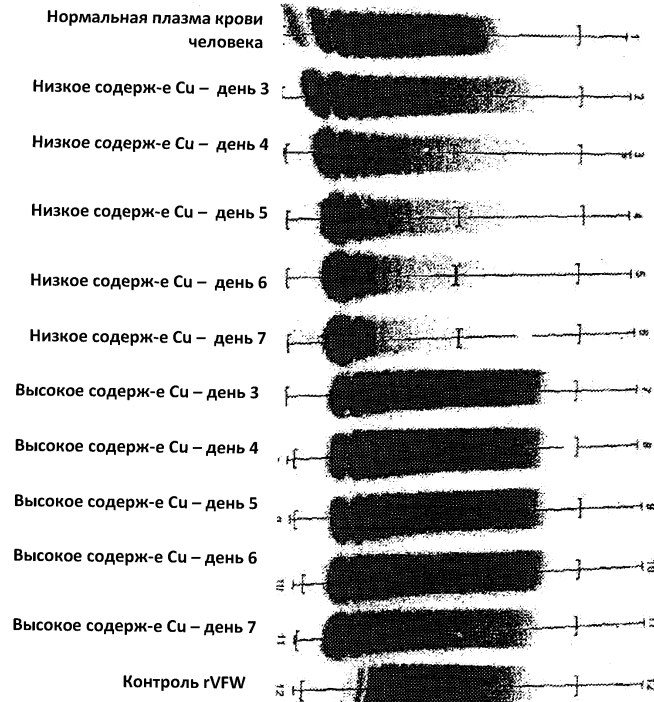
23. Способ по любому из пп.1-22, где указанная соль меди выбрана из сульфата меди, ацетата меди, карбоната меди, хлорида меди, гидроксида меди, нитрата меди и оксида меди.

24. Способ по п.23, где указанная соль меди представляет собой  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

25. Культуральная жидкость клеток млекопитающего, содержащая rVWF и обладающая удельной ристоцетин-кофакторной активностью rVWF, составляющей по меньшей мере 30 мЕ/мкг rVWF, которая получена способом по любому из предыдущих пунктов.

26. Культуральная жидкость по п.25, отличающаяся тем, что содержит рекомбинантный фактор VIII (rFVIII).

27. Культуральная жидкость по п.26 в форме для фармацевтического введения.



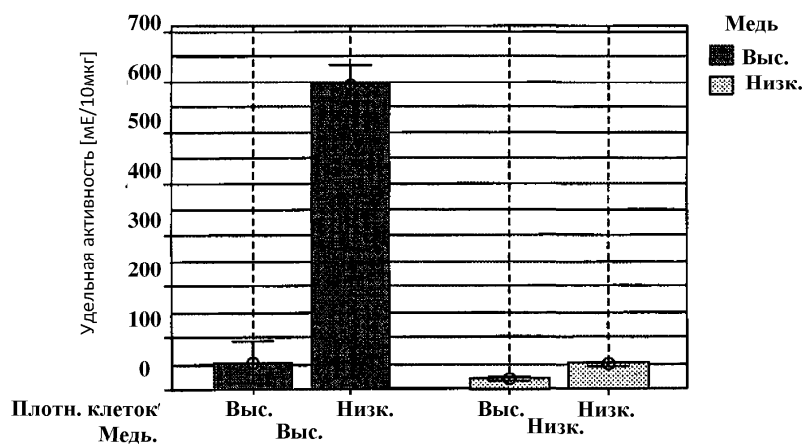
Фиг. 1А

| Номер полосы | Номер зоны | Примеси<br>Int ×mm | Относит. кол-во |
|--------------|------------|--------------------|-----------------|
| 1            | 1          | 809715,2           | 74,5            |
| 1            | 2          | 277519,7           | 25,5            |
| 2            | 1          | 681110,1           | 83,7            |
| 2            | 2          | 132376,5           | 16,3            |
| 3            | 1          | 568177             | 90,2            |
| 3            | 2          | 61619,3            | 9,8             |
| 4            | 1          | 500725,4           | 94,0            |
| 4            | 2          | 31815,3            | 6,0             |
| 5            | 1          | 433194,4           | 95,9            |
| 5            | 4          | 18307,3            | 4,1             |
| 6            | 1          | 412190,2           | 95,9            |
| 6            | 2          | 17441              | 4,1             |
| 7            | 1          | 842215,1           | 72,0            |
| 7            | 2          | 327960,1           | 28,0            |
| 8            | 1          | 723836,4           | 70,5            |
| 8            | 2          | 303095,4           | 29,5            |
| 9            | 1          | 739912,7           | 68,7            |
| 9            | 2          | 337575,1           | 31,3            |
| 10           | 1          | 929848,4           | 68,6            |
| 10           | 2          | 425784,2           | 31,4            |
| 11           | 1          | 684679,9           | 78,6            |
| 11           | 2          | 185964,5           | 21,4            |
| 12           | 3          | 512298,6           | 66,7            |
| 12           | 4          | 256326,7           | 33,3            |

Фиг. 1В

Интервальный график удельной активности [mE/10мкг]

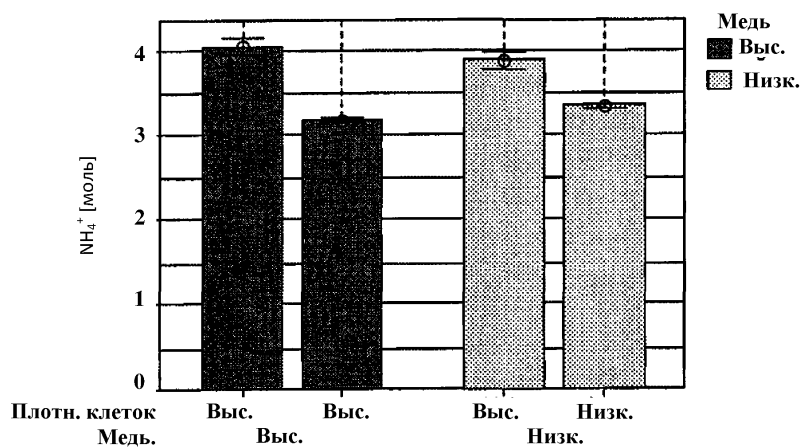
90% CI для среднего



Фиг. 2А

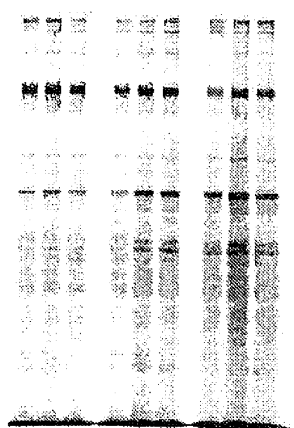
Интервальный график  $\text{NH}_4^+$  [ммоль/г]

90% CI для среднего



Фиг. 2В

4 мкг/л 1 мкг/л 0,66 мкг/л



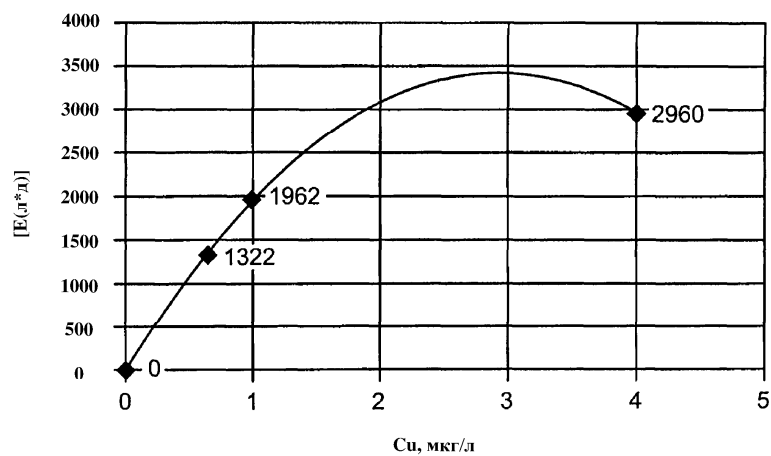
Фиг. 3А

4 мкг/л 1 мкг/л 0,66 мкг/л



Фиг. 3В

Р Frets/Медь



$$y = -400,37x^2 + 2344,5x - 11,267$$

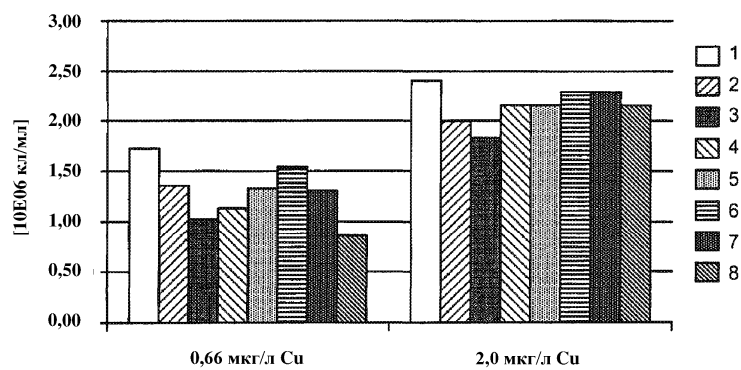
$$R^2 = 0,9994$$

◆ среднее по 4-м неделям CST

— Poly. (среднее по 4 нед. CST)

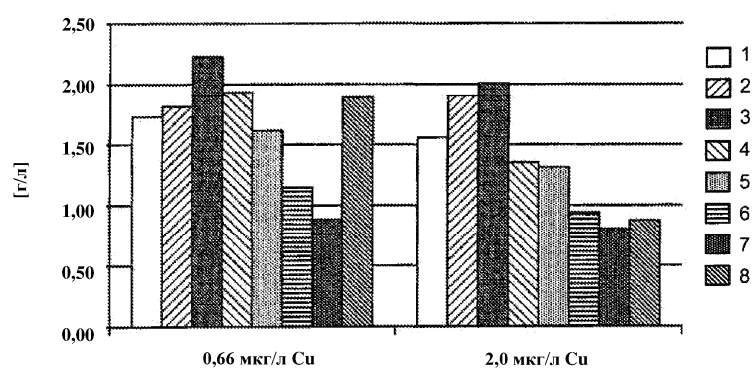
Фиг. 4

ZZ Nuc

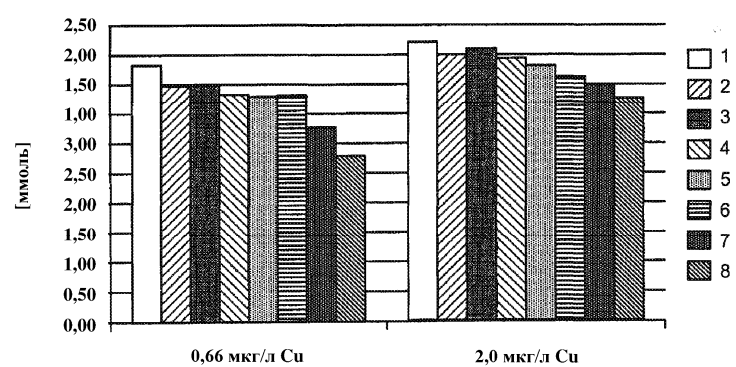


Фиг. 5А

## Остаточная глюкоза

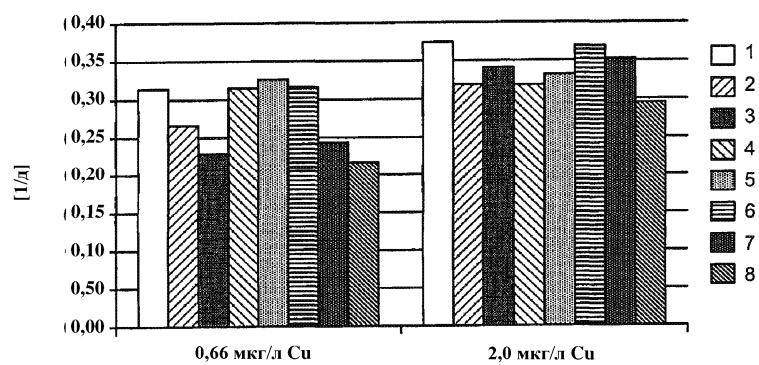


Фиг. 5B

NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

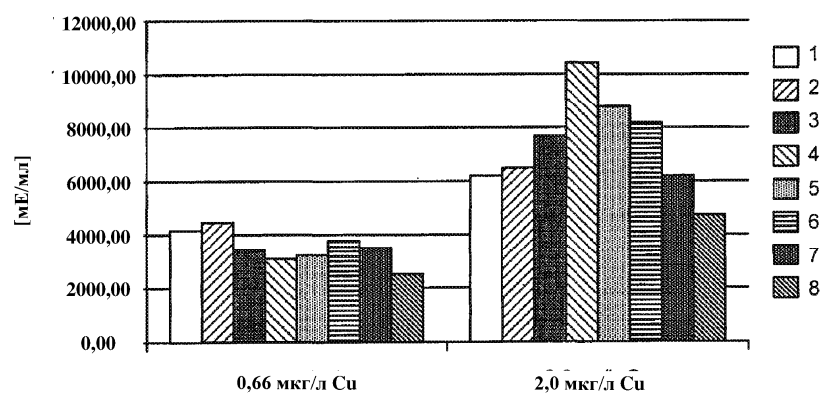
Фиг. 5C

## μ



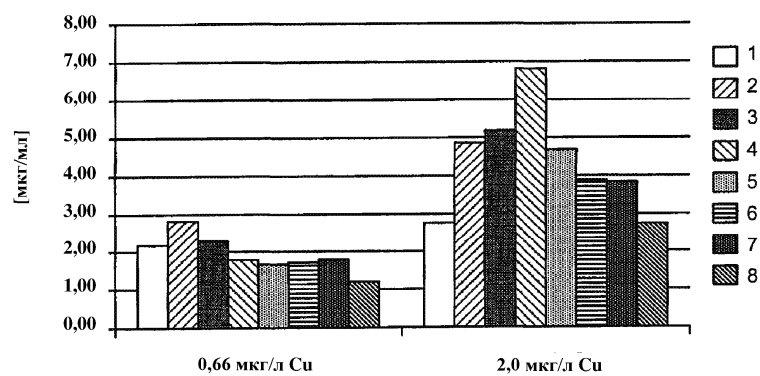
Фиг. 5D

## A13 Frets



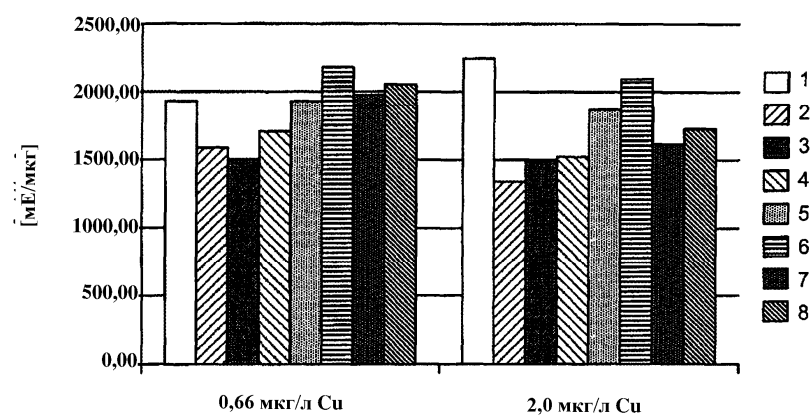
Фиг. 5E

A13 Elisa



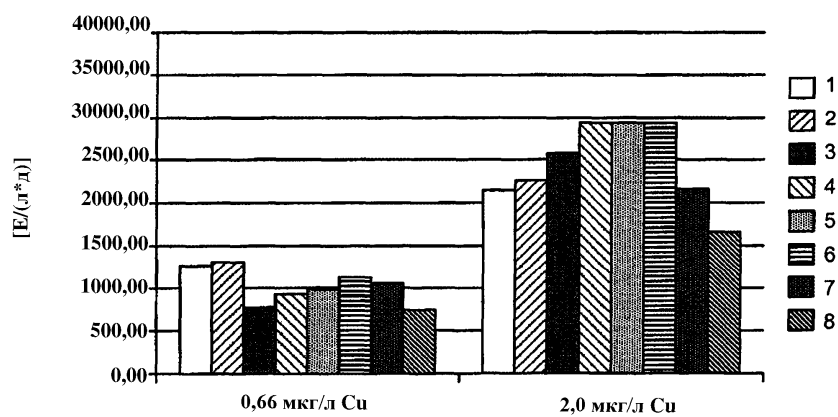
Фиг. 5F

Удельная активность



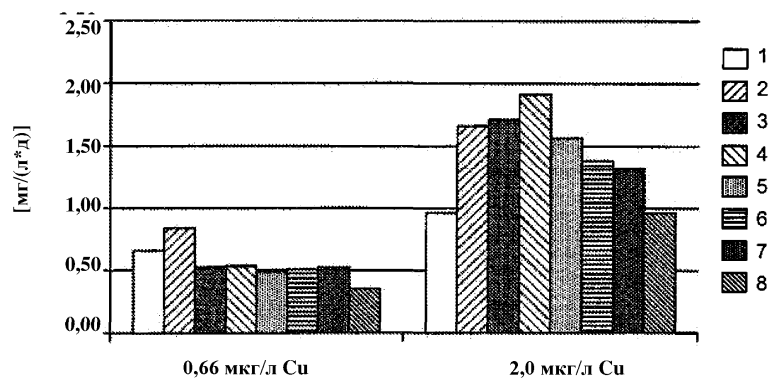
Фиг. 5G

P A13 FRETS



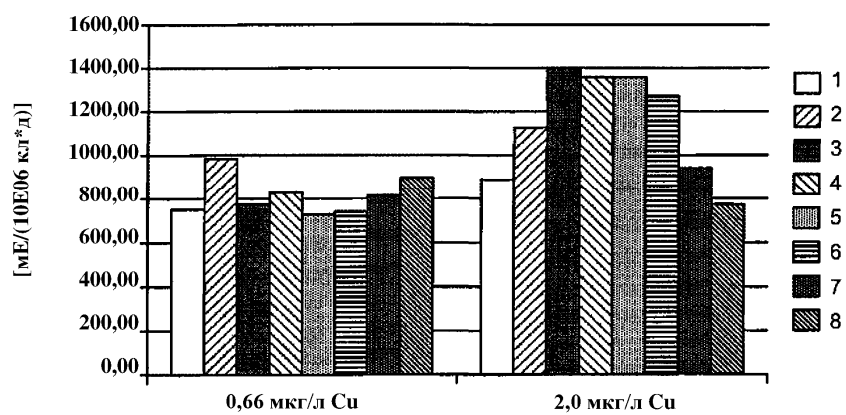
Фиг. 5H

P A13 Elisa



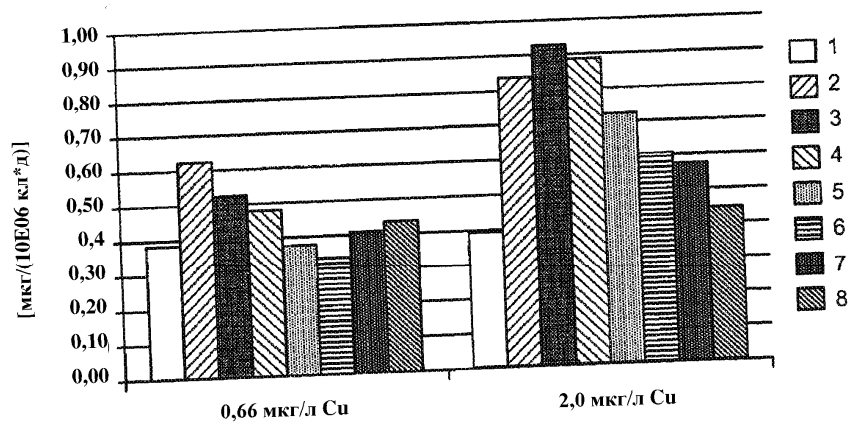
Фиг. 5I

q A13 FRETS

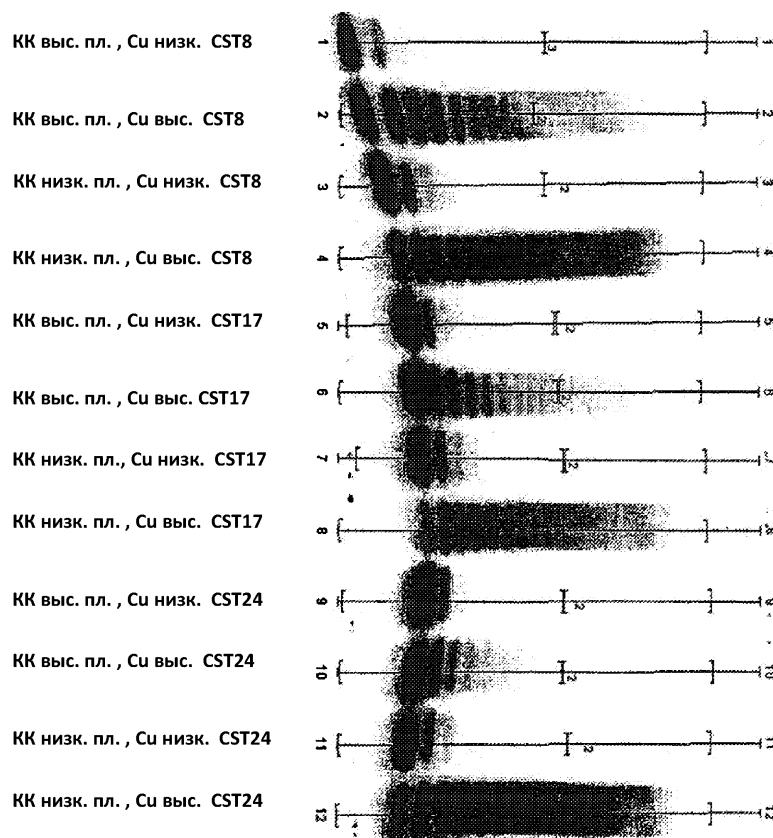


Фиг. 5J

q A13 ELISA



Фиг. 5K



Фиг. 6А

| Номер полосы | Номер зоны | Примеси<br>Int×mm | Относит. кол-во |
|--------------|------------|-------------------|-----------------|
| 1            | 1          | 155657,0          | 97,2            |
| 1            | 2          | 4453,3            | 2,8             |
| 2            | 1          | 419998,6          | 87,6            |
| 2            | 2          | 59416,6           | 12,4            |
| 3            | 1          | 225344,4          | 97,4            |
| 3            | 2          | 5898,2            | 2,6             |
| 4            | 1          | 557340,0          | 73,2            |
| 4            | 2          | 203807,5          | 26,8            |
| 5            | 1          | 248653,8          | 97,8            |
| 5            | 2          | 5599,8            | 2,2             |
| 6            | 1          | 434040,2          | 95,4            |
| 6            | 2          | 20823,4           | 4,6             |
| 7            | 1          | 238580,2          | 97,9            |
| 7            | 2          | 5159,7            | 2,1             |
| 8            | 1          | 322940,6          | 77,3            |
| 8            | 2          | 94677,8           | 22,7            |
| 9            | 1          | 250356,6          | 98,0            |
| 9            | 2          | 5183,5            | 2,0             |
| 10           | 1          | 275819,1          | 97,7            |
| 10           | 2          | 6469,7            | 2,3             |
| 11           | 1          | 207447,3          | 97,3            |
| 11           | 2          | 5687,5            | 2,7             |
| 12           | 1          | 604779,1          | 76,2            |
| 12           | 2          | 189356,4          | 23,8            |

Процент  
gIFN-  
секретирую-  
щих CD8+-

Фиг. 6В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2