

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202090067** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2020.04.30**

(22) Дата подачи заявки  
**2011.07.08**

(51) Int. Cl. *C07K 1/00* (2006.01)  
*C07K 14/745* (2006.01)  
*C12N 5/02* (2006.01)  
*C12N 5/10* (2006.01)  
*A61K 38/36* (2006.01)

---

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ADAMTS13 В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК**

---

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

(32) **2010.07.08**

(33) **US**

(62) **201792340; 2011.07.08**

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

(72) Изобретатель:

**Грильбергер Леопольд, Райтер  
Манфред, Фляйшандерль Даниель,  
Брамбергер Грегор (AT)**

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

(57) Настоящее изобретение относится, среди прочих аспектов, к условиям культивирования клеток для получения высокомолекулярного vWF, в частности WF, состоящего из большого количества мультимеров, с высокой удельной активностью и ADAMTS13 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 (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Настоящее изобретение также обеспечивает способы культивирования клеток в условиях клеточной культуры для экспрессии высокомолекулярных vWF и tA13, обладающих высокой удельной активностью.

**202090067**

**A2**

**A2**

**202090067**

**СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ADAMTS13 В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК**

## ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА ЗАЯВКИ

[0001] 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

[0002] Рекombинантная 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 литров до более чем 20 000 литров. 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.

[0003] 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.

[0004] 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.

[0005] 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.

[0006] В EP-A-0 481 791 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%

(масса/объем) пептона расщепленной папайном сои, и путресцин. В WO 98/08934 описана бессывороточная культура эукариотических клеток, содержащая гидролизованные соевые пептиды (1-1000 мг/л), от 0,01 до 1 мг/л путресцина и разнообразные компоненты животного происхождения, включая альбумин, фетуин, 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.

[0007] 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 троекратной) 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.

[0008] 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).

[0009] 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 10 000. 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 часов. Таким образом, профилактическая терапия требует инфузий 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.

[0010] Снижение частоты инфузий 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 часов, что заметно меньше 10-30 часов, 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.

[0011] 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 Gp1b $\alpha$  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.

[0012] 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 Gp1b $\alpha$ -опосредованного связывания тромбоцитов, а именно типы 2A, 2B и 2M (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 Gp1b $\alpha$  представляет собой целесообразную стратегию для лечения как гемофилии, так и болезни Виллебранда.

[0013] 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 обладает 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 кДНК vWF; указанный прополипептид соответствует аминокислотным остаткам 23-764 полноразмерного препро-vWF (Eikenboom et al (1995) Haemophilia 1, 77-90).

[0014] 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 клеток 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):13498-13503, 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.

[0015] 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.

[0016] 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 GC, Curr Pharm Biotechnol. 2006 Feb;7(1):25-31), являются секретлируемыми ферментами, для которых установлена связь с рядом заболеваний и состояний, включая тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП) (Moake JL, Semin Hematol. 2004 Jan;41(1):4-14), соединительнотканное расстройство, 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 GC, 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, КГЭ и патогены типа бактерий *Mycoplasma*.

[0017] 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 ADAMTS13 с некоторыми состояниями, такими как ТТП (Moake JL, 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).

[0018] Протеаза ADAMTS13 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 ADAMTS13 в культурах клеток млекопитающих сопряжена с множеством трудностей.

[0019] 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

[0020] 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.

[0021] Согласно своему первому аспекту 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 до конечной концентрации меди по меньшей мере 2,4 мкг/л; (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 указанный отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью rVWF, составляющей по меньшей мере 30 мЕ/мкг rVWF.

[0022] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов указанный способ дополнительно включает этап добавления в указанную основную среду для клеточных культур гидролизата перед культивированием указанной одной или более клеток.

[0023] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов указанный гидролизат представляет собой растительный гидролизат. Согласно конкретному варианту реализации указанный гидролизат представляет собой соевый гидролизат.

[0024] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов основная среда для клеточных культур представляют собой не содержащую животных белков культуральную среду.

[0025] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов основные среды для клеточных культур представляют собой не содержащие белков культуральные среды.

[0026] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов указанные основные среды для клеточных культур представляет собой культуральные среды с заданным химическим составом.

[0027] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов конечная концентрация меди в основной среде для клеточных культур с добавлением меди составляет по меньшей мере 4 мкг/л меди.

[0028] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов конечная концентрация меди в основной среде для клеточных культур с добавлением меди составляет от 2,4 мкг/л до 20 мкг/л меди.

[0029] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов медь добавляют в основные среды для клеточных культур в виде соли меди, хелата меди или их комбинации.

[0030] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов указанная соль меди выбрана из группы, состоящей из сульфата меди, ацетата меди, карбоната меди, хлорида меди, гидроксида меди, нитрата меди и оксида меди.

[0031] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов указанная одна или более клеток представляет собой клетку млекопитающего. Согласно конкретному варианту реализации указанные клетки млекопитающих представляют собой клетки CHO.

[0032] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов культивирование указанной одной или более клеток включает периодическое культивирование указанных клеток.

[0033] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов культивирование указанной одной или более клеток включает непрерывное культивирование указанных клеток. Согласно конкретному варианту реализации непрерывное культивирование клеток производится в хеостатическом режиме. Согласно другому конкретному варианту реализации непрерывное культивирование клеток производится в режиме перфузии.

[0034] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов указанную одну или более клеток культивируют по меньшей мере в 100 л дополненной основной среды для клеточных культур.

[0035] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов плотность клеток поддерживают на уровне менее чем  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл на протяжении этапа культивирования указанной одной или более клеток.

[0036] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов плотность клеток поддерживают на уровне менее чем  $2,0 \times 10^6$  клеток/мл на протяжении этапа культивирования указанной одной или более клеток.

[0037] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов плотность клеток поддерживают на уровне менее чем  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл на протяжении этапа культивирования указанной одной или более клеток.

[0038] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов этап отделения по меньшей мере части указанного культурального супернатанта включает фильтрацию или центрифугирование для удаления клеток из части культурального супернатанта.

[0039] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью rVWF, составляющей по меньшей мере 40 мЕ/мкг rVWF. Согласно конкретному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью rVWF, составляющей по меньшей мере 50 мЕ/мкг rVWF. Согласно более конкретному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью rVWF, составляющей по меньшей мере 60 мЕ/мкг rVWF. Согласно более конкретному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью rVWF, составляющей по меньшей мере 70 мЕ/мкг rVWF. Согласно еще одному более конкретному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью rVWF, составляющей по меньшей мере 80 мЕ/мкг rVWF.

[0040] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов по меньшей мере 10% rVWF в указанном супернатанте 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.

[0041] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов указанный супернатант содержит высокомолекулярные мультимеры VWF из 14-22 димеров.

[0042] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов содержание  $\text{NH}_4^+$  в указанном культуральном супернатанте поддерживают на уровне концентрации ниже 10 мМ.

[0043] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов содержание  $\text{NH}_4^+$  в указанном культуральном супернатанте поддерживают на уровне концентрации ниже 4 мМ.

[0044] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов rVWF коэкспрессируется с рекомбинантным фактором

VIII (rFVIII). Согласно конкретному варианту реализации указанный способ дополнительно включает этап очистки rVWF от по меньшей мере 50% rFVIII, присутствующего в отделенном супернатанте. Согласно одному из вариантов реализации отношение rVWF к rFVIII после этапа очистки составляет по меньшей мере 10:1.

[0045] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов указанный способ дополнительно включает этап обогащения rVWF.

[0046] Согласно второму аспекту настоящее изобретение обеспечивает композицию рекомбинантного фактора фон Виллебранда (rVWF), полученную описанным в настоящей заявке способом.

[0047] Согласно одному варианту реализации вышеописанных композиций указанная композиция также содержит рекомбинантный фактор VIII (rFVIII). Согласно конкретному варианту реализации отношение rVWF к rFVIII составляет по меньшей мере 10:1.

[0048] Согласно одному варианту реализации вышеописанных композиций указанную композицию получают в форме для фармацевтического введения. Согласно конкретному варианту реализации указанную композицию получают в форме для внутривенного введения.

[0049] Согласно третьему аспекту настоящее изобретение обеспечивает супернатант культуры клеток, содержащий рекомбинантный фактор фон Виллебранда (rVWF), отличающийся тем, что указанный супернатант получают описанным в настоящей заявке способом.

[0050] Согласно четвертому аспекту настоящее изобретение обеспечивает супернатант культуры клеток, содержащий рекомбинантный фактор фон Виллебранда (rVWF), при этом по меньшей мере 10% rVWF в указанном супернатанте присутствует в виде высокомолекулярного VWF мультимера из более чем 10 димеров. Согласно конкретному варианту реализации по меньшей мере 15% rVWF в указанном супернатанте присутствует в виде высокомолекулярного VWF мультимера из более чем 10 димеров. Согласно другому конкретному варианту реализации по меньшей мере 20% rVWF в указанном супернатанте присутствует в виде высокомолекулярного VWF мультимера из более чем 10 димеров. Согласно другому конкретному варианту реализации по меньшей мере 25% rVWF в указанном супернатанте присутствует в виде высокомолекулярного VWF мультимера из более чем 10 димеров.

Согласно другому конкретному варианту реализации по меньшей мере 30% rVWF в указанном супернатанте присутствует в виде высокомолекулярного VWF мультимера из более чем 10 димеров. Согласно еще одному конкретному варианту реализации вышеописанных супернатантов указанный супернатант получают согласно описанному в настоящей заявке способу.

[0051] Согласно пятому аспекту настоящее изобретение обеспечивает супернатант культуры клеток, содержащий рекомбинантный фактор фон Виллебранда (rVWF), отличающийся тем, что указанный супернатант содержит по меньшей мере 0,4 МЕ ристоцетин-кофакторной активности на мл. Согласно конкретному варианту реализации указанный супернатант содержит по меньшей мере 0,5 МЕ ристоцетин-кофакторной активности на мл. Согласно другому конкретному варианту реализации указанный супернатант содержит по меньшей мере 0,6 МЕ ристоцетин-кофакторной активности на мл. Согласно другому конкретному варианту реализации указанный супернатант содержит по меньшей мере 0,7 МЕ ристоцетин-кофакторной активности на мл. Согласно еще одному конкретному варианту реализации вышеописанных супернатантов супернатант получают согласно описанному в настоящей заявке способу.

[0052] Согласно шестому аспекту 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 по меньшей мере 1,0 мкг/л; (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.

[0053] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов основные среды для клеточных культур представляют собой не содержащие животных белков культуральные среды.

[0054] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов основные среды для клеточных культур представляют собой не содержащие белков культуральные среды.

[0055] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов основные среды для клеточных культур представляют собой культуральные среды с заданным химическим составом.

[0056] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов конечная концентрация меди в дополненных основной среде для клеточных культур составляет по меньшей мере 1 мкг/л меди.

[0057] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов конечная концентрация меди в дополненных основной среде для клеточных культур составляет по меньшей мере 2 мкг/л меди.

[0058] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов конечная концентрация меди в дополненных основной среде для клеточных культур составляет по меньшей мере 4 мкг/л меди.

[0059] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов конечная концентрация меди в дополненных основной среде для клеточных культур составляет от 1 мкг/л до 6 мкг/л меди.

[0060] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов конечная концентрация меди в дополненных основной среде для клеточных культур составляет от 2 мкг/л до 4 мкг/л меди.

[0061] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов медь добавляют в основные среды для клеточных культур в виде соли меди, хелата меди или их комбинаций. 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.

[0062] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов указанная одна или более клеток представляет собой клетку млекопитающего. Согласно конкретному варианту реализации указанные клетки млекопитающих представляют собой клетки CHO.

[0063] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов культивирование указанной одной или более клеток включает периодическое культивирование указанных клеток.

[0064] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов культивирование указанной одной или более клеток включает непрерывное культивирование указанных клеток. Согласно конкретному варианту реализации указанное непрерывное культивирование клеток производится в хеостатическом режиме. Согласно другому конкретному варианту реализации указанное непрерывное культивирование клеток производится в режиме перфузии.

[0065] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов указанную одну или более клеток культивируют по меньшей мере в 100 л дополненной основной среды для клеточных культур.

[0066] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов плотность клеток поддерживают на уровне менее чем  $4,0 \times 10^6$  клеток/мл на протяжении этапа культивирования указанной одной или более клеток.

[0067] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов плотность клеток поддерживают на уровне менее чем  $3,5 \times 10^6$  клеток/мл на протяжении этапа культивирования указанной одной или более клеток.

[0068] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов плотность клеток поддерживают на уровне менее чем  $3,0 \times 10^6$  клеток/мл на протяжении этапа культивирования указанной одной или более клеток.

[0069] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов плотность клеток поддерживают на уровне менее чем  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл на протяжении этапа культивирования указанной одной или более клеток.

[0070] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов плотность клеток поддерживают на уровне менее чем  $2,0 \times 10^6$  клеток/мл на протяжении этапа культивирования указанной одной или более клеток.

[0071] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов плотность клеток поддерживают на уровне менее чем  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл на протяжении этапа культивирования указанной одной или более клеток.

[0072] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов этап отделения по меньшей мере части указанного культурального супернатанта включает фильтрацию или

центрифугирование для удаления клеток из указанной части культурального супернатанта.

[0073] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2000 единиц активности FRETС-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день.

[0074] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2500 единиц активности FRETС-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день.

[0075] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов отделенный супернатант обладает удельной FRETС-VWF73 активностью rA13, составляющей по меньшей мере 800 МЕ/мкг.

[0076] Согласно предпочтительному варианту реализации описанных выше способов отделенный супернатант обладает удельной FRETС-VWF73 активностью rA13, составляющей по меньшей мере 1200 МЕ/мкг.

[0077] Согласно более предпочтительному варианту реализации описанных выше способов отделенный супернатант обладает удельной FRETС-VWF73 активностью rA13, составляющей по меньшей мере 1600 МЕ/мкг.

[0078] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов содержание  $\text{NH}_4^+$  в указанном культуральном супернатанте поддерживают на уровне ниже 10 мМ.

[0079] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов содержание  $\text{NH}_4^+$  в указанном культуральном супернатанте поддерживают на уровне ниже 5 мМ.

[0080] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов содержание  $\text{NH}_4^+$  в указанном культуральном супернатанте поддерживают на уровне концентрации ниже 4 мМ.

[0081] Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов указанный способ дополнительно включает этап обогащения rA13.

[0082] Согласно седьмому аспекту настоящее изобретение обеспечивает супернатант культуры клеток, содержащий рекомбинантный ADAMTS13 (rA13), отличающийся тем, что указанный супернатант получают описанным в настоящей заявке способом.

[0083] Согласно восьмому аспекту настоящее изобретение обеспечивает супернатант культуры клеток, содержащий рекомбинантный ADAMTS13 (rA13), отличающийся тем, что указанный

супернатант содержит по меньшей мере 5 единиц активности FRETС-VWВ73 на мл. Согласно конкретному варианту реализации указанный супернатант содержит по меньшей мере 6 единиц активности FRETС-VWВ73 на мл. Согласно другому конкретному варианту реализации указанный супернатант содержит по меньшей мере 7 единиц активности FRETС-VWВ73 на мл. Согласно другому конкретному варианту реализации указанный супернатант содержит по меньшей мере 8 единиц активности FRETС-VWВ73 на мл. Согласно другому конкретному варианту реализации указанный супернатант содержит по меньшей мере 9 единиц активности FRETС-VWВ73 на мл. Согласно другому конкретному варианту реализации указанный супернатант содержит по меньшей мере 10 единиц активности FRETС-VWВ73 на мл. Согласно еще одному конкретному варианту реализации вышеописанных супернатантов супернатант получают согласно описанному в настоящей заявке способу.

[0084] Согласно девятому аспекту настоящее изобретение обеспечивает супернатант культуры клеток, содержащий рекомбинантный ADAMTS13 (rA13), при этом указанный супернатант содержит по меньшей мере 2 мкг rA13 на мл. Согласно конкретному варианту реализации супернатант содержит по меньшей мере 3 мкг rA13 на мл. Согласно другому конкретному варианту реализации супернатант содержит по меньшей мере 4 мкг rA13 на мл. Согласно другому конкретному варианту реализации супернатант содержит по меньшей мере 5 мкг rA13 на мл. Согласно другому конкретному варианту реализации супернатант содержит по меньшей мере 6 мкг rA13 на мл. Согласно еще одному конкретному варианту реализации вышеописанных супернатантов супернатант получают согласно описанному в настоящей заявке способу.

[0085] Согласно десятому аспекту в соответствии с настоящим изобретением предложена композиция рекомбинантного ADAMTS13 (rA13), полученная согласно любому из вышеописанных способов.

[0086] Согласно одному варианту реализации вышеописанных композиций указанную композицию получают в форме для фармацевтического введения. Согласно конкретному варианту реализации указанную композицию получают в форме для внутривенного введения.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0087] **Фиг. 1. (1А)** Электрофорез в агарозном геле низкого разрешения (1%) rVWВ, 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 **табл. 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. 1A, количественно определяли денситометрическим анализом.

[0088] **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.

[0089] **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.

[0090] **Фиг. 4.** График зависимости объемной продуктивности (P Frets) от концентрации меди, показывающий экстраполированный (сплошная линия) эффект оптимальной концентрации меди на выработку rA13.

[0091] **Фиг. 5A-K.** Ступенчатые диаграммы при непрерывном суспензионном (хеостатическом) 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 хеостатической культуры. Легенда относится к конкретным неделям, для которых представлены данные.

[0092] **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**

[0093] Рекомбинантный vWF (rVWF) и рекомбинантный ADAMTS13 (rA13) могут быть получены посредством 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 rA13, полученных из плазмы крови. Кроме того, rVWF, 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 rVWF и rA13 представляют особые сложности при создании культур для крупномасштабного производства (т.е. от 10 до более чем 20 000-литровых культур).

[0094] Одним из потенциальных источников вариабельности, 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 rVWF и rA13. 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 rVWF и rA13 и/или также могло приводить к увеличению общего выхода белка. Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением предложены способы и композиции для высокопродуктивного получения rVWF и белков rA13 с высокой удельной активностью.

[0095] Согласно одному из аспектов в соответствии с настоящим изобретением предложены способы культивирования клеток и композиции для получения больших количеств rVWF и rA13, обладающих активностью, сравнимой или превышающей активностью, проявляемую происходящим из плазмы vWF (pdVWF) или происходящим из плазмы ADAMTS13 (pdA13). Согласно дальнейшим аспектам белки rVWF и rA13, 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 rVWF и rA13, 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 rVWF и rA13 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.

[0096] 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.

[0097] 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 rVWF. 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 rVWF. Согласно дальнейшим вариантам реализации указанная основная среда для клеточной культуры может, помимо добавленной меди, также содержать один или более гидролизат.

[0098] 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 rA13. 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 rA13. 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.

[0099] 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.

[0100] 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 л, 50 л, 100 л, 150 л, 200 л, 250 л, 500 л, 750 л, 1000 л, 1500 л, 2000 л, 5000 л, 10 000 л или 20 000 литров.

[0101] 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.

[0102] Дальнейшие преимущества способов и композиций согласно настоящему изобретению заключаются в получении популяции белков с высоким процентным содержанием (более 10%) высокомультимеризованного rVWF.

[0103] Хотя значительная часть обсуждения белков ADAMTS в настоящей заявке относится к ADAMTS13 (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**

[0104] Используемый в настоящей заявке термин «рекомбинантный vWF» включает vWF полученный с применением технологии рекомбинантной ДНК. Согласно определенным вариантам реализации белка 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.

[0105] 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.

[0106] 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. Мутантные 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*.

[0107] Термины «высокомультимерный vWF», «высокомолекулярный vWF» и «HMW VWF» могут использоваться 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.

[0108] 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.

[0109] 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, собачьи, кошачьи, и их биологически активные производные. Мутантные и вариантыные 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*.

[0110] Используемый в настоящей заявке термин «белок ADAMTS13» относится к любому белку или полипептиду, обладающему активностью ADAMTS13, в частности, способностью расщеплять пептидную связь между остатками Tyr-842 и Met-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.

[0111] 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, Scheiflinger 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.

[0112] 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.

[0113] 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 rA13 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 очищению композиции. В этом смысле очистка не подразумевает, что очищенное соединение будет гомогенным, например, чистым на 100%.

[0114] 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 турбодиметрическим 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*.

[0115] 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 FRET5-VWF73 представляет собой уровень активности, необходимый для расщепления такого же количества субстрата FRET5-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.

[0116] 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 rVWF или rA13. 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).

[0117] Используемые в настоящей заявке термины «витамин В3», «никотинамид», «ниацинамид», «ниацин» и «никотиновая кислота» могут использоваться взаимозаменяемо, относясь к любому члену семейства витаминов В3. Соответственно, любой член указанного семейства может быть использован для добавления в среду, применяемую в способах согласно настоящему изобретению.

[0118] 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.

[0119] 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.

[0120] Используемый в настоящей заявке термин «бессывороточная культуральная среда» или «бессывороточная 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.

[0121] 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.

[0122] 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**

[0123] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к средам для клеточных культур для получения rVWF и/или rA13, обладающих повышенной активностью по сравнению с rVWF и rA13, полученных с применением основных сред для клеточных культур. Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к средам для клеточных культур для получения rVWF и/или rA13, 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 rA13, управляют таким образом, чтобы поддерживать в супернатанте культуры клеток низкий уровень аммония, т.е. менее чем 10 мМ и, предпочтительно, менее чем 5 мМ.

[0124] 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.

[0125] 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 rA13 согласно настоящему изобретению, которые проявляют высокую удельную активность.

[0126] 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).

[0127] Согласно определенным вариантам реализации медь может вводиться в культуральные среды, сама по себе или вместе с гидролизатом, путем введения средней добавки, включая подходящую соль меди или хелат меди. Подходящая медь соли 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-дiazациклододекан, 1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан-5,7-дион, 1,4,7-триазациклононана тригидрохлорид, 1-окса-4,7,10-триазациклододекан, 1,4,8,12-тетраазациклопентадекан и 1,4,7,10-тетраазациклододекан.

[0128] 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.

[0129] 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  $5\text{H}_2\text{O}$ ).

[0130] 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 мМ, 9 мМ, 8 мМ, 7 мМ, 6 мМ, 5 мМ, 4 мМ, 3 мМ, 2 мМ, 1 мМ или менее.

[0131] 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 настоящему описанию.

III.	IV.	Концентрация аммония										
		Н.О.	НБЧ 10м М	НБЧ 9мМ	НБЧ 8мМ	НБЧ 7мМ	НБЧ 6мМ	НБЧ 5мМ	НБЧ 4мМ	НБЧ 3мМ	НБЧ 2мМ	НБЧ 1мМ
Концентрация меди	ПММ 1 мкг/л	Вар. 1	Вар. 41	Вар. 81	Вар. 121	Вар. 161	Вар. 201	Вар. 241	Вар. 281	Вар. 321	Вар. 361	Вар. 401
	ПММ 2 мкг/л	Вар. 2	Вар. 42	Вар. 82	Вар. 122	Вар. 162	Вар. 202	Вар. 242	Вар. 282	Вар. 322	Вар. 362	Вар. 402
	ПММ 3 мкг/л	Вар. 3	Вар. 43	Вар. 83	Вар. 123	Вар. 163	Вар. 203	Вар. 243	Вар. 283	Вар. 323	Вар. 363	Вар. 403
	ПММ 4 мкг/л	Вар. 4	Вар. 44	Вар. 84	Вар. 124	Вар. 164	Вар. 204	Вар. 244	Вар. 284	Вар. 324	Вар. 364	Вар. 404
	ПММ 5 мкг/л	Вар. 5	Вар. 45	Вар. 85	Вар. 125	Вар. 165	Вар. 205	Вар. 245	Вар. 285	Вар. 325	Вар. 365	Вар. 405
	ПММ 6 мкг/л	Вар. 6	Вар. 46	Вар. 86	Вар. 126	Вар. 166	Вар. 206	Вар. 246	Вар. 286	Вар. 326	Вар. 366	Вар. 406
	ПММ 7 мкг/л	Вар. 7	Вар. 47	Вар. 87	Вар. 127	Вар. 167	Вар. 207	Вар. 247	Вар. 287	Вар. 327	Вар. 367	Вар. 407

ПММ 8 мкг/л	Вар. 8	Вар. 48	Вар. 88	Вар. 128	Вар. 168	Вар. 208	Вар. 248	Вар. 288	Вар. 328	Вар. 368	Вар. 408
ПММ 9 мкг/л	Вар. 9	Вар. 49	Вар. 89	Вар. 129	Вар. 169	Вар. 209	Вар. 249	Вар. 289	Вар. 329	Вар. 369	Вар. 409
ПММ 10 мкг/л	Вар. 10	Вар. 50	Вар. 90	Вар. 130	Вар. 170	Вар. 210	Вар. 250	Вар. 290	Вар. 330	Вар. 370	Вар. 410
Приблизительно 1 мкг/л	Вар. 11	Вар. 51	Вар. 91	Вар. 131	Вар. 171	Вар. 211	Вар. 251	Вар. 291	Вар. 331	Вар. 371	Вар. 411
Приблизительно 1,5 мкг/л	Вар. 12	Вар. 52	Вар. 92	Вар. 132	Вар. 172	Вар. 212	Вар. 252	Вар. 292	Вар. 332	Вар. 372	Вар. 412
Приблизительно 2 мкг/л	Вар. 13	Вар. 53	Вар. 93	Вар. 133	Вар. 173	Вар. 213	Вар. 253	Вар. 293	Вар. 333	Вар. 373	Вар. 413
Приблизительно 2,5 мкг/л	Вар. 14	Вар. 54	Вар. 94	Вар. 134	Вар. 174	Вар. 214	Вар. 254	Вар. 294	Вар. 334	Вар. 374	Вар. 414
Приблизительно 3 мкг/л	Вар. 15	Вар. 55	Вар. 95	Вар. 135	Вар. 175	Вар. 215	Вар. 255	Вар. 295	Вар. 335	Вар. 375	Вар. 415
Приблизительно 3,5 мкг/л	Вар. 16	Вар. 56	Вар. 96	Вар. 136	Вар. 176	Вар. 216	Вар. 256	Вар. 296	Вар. 336	Вар. 376	Вар. 416
Приблизительно 4 мкг/л	Вар. 17	Вар. 57	Вар. 97	Вар. 137	Вар. 177	Вар. 217	Вар. 257	Вар. 297	Вар. 337	Вар. 377	Вар. 417
Приблизительно 4,5 мкг/л	Вар. 18	Вар. 58	Вар. 98	Вар. 138	Вар. 178	Вар. 218	Вар. 258	Вар. 298	Вар. 338	Вар. 378	Вар. 418
Приблизительно 5 мкг/л	Вар. 19	Вар. 59	Вар. 99	Вар. 139	Вар. 179	Вар. 219	Вар. 259	Вар. 299	Вар. 339	Вар. 379	Вар. 419
Приблизительно 5,5 мкг/л	Вар. 20	Вар. 60	Вар. 100	Вар. 140	Вар. 180	Вар. 220	Вар. 260	Вар. 300	Вар. 340	Вар. 380	Вар. 420
Приблизительно 6 мкг/л	Вар. 21	Вар. 61	Вар. 101	Вар. 141	Вар. 181	Вар. 221	Вар. 261	Вар. 301	Вар. 341	Вар. 381	Вар. 421
Приблизительно 7 мкг/л	Вар. 22	Вар. 62	Вар. 102	Вар. 142	Вар. 182	Вар. 222	Вар. 262	Вар. 302	Вар. 342	Вар. 382	Вар. 422
Приблизительно 8 мкг/л	Вар. 23	Вар. 63	Вар. 103	Вар. 143	Вар. 183	Вар. 223	Вар. 263	Вар. 303	Вар. 343	Вар. 383	Вар. 423
Приблизительно 9 мкг/л	Вар. 24	Вар. 64	Вар. 104	Вар. 144	Вар. 184	Вар. 224	Вар. 264	Вар. 304	Вар. 344	Вар. 384	Вар. 424
Приблизительно 10 мкг/л	Вар. 25	Вар. 65	Вар. 105	Вар. 145	Вар. 185	Вар. 225	Вар. 265	Вар. 305	Вар. 345	Вар. 385	Вар. 425
1-20 мкг/л	Вар. 26	Вар. 66	Вар. 106	Вар. 146	Вар. 186	Вар. 226	Вар. 266	Вар. 306	Вар. 346	Вар. 386	Вар. 426
2-20 мкг/л	Вар. 27	Вар. 67	Вар. 107	Вар. 147	Вар. 187	Вар. 227	Вар. 267	Вар. 307	Вар. 347	Вар. 387	Вар. 427
1-10 мкг/л	Вар. 28	Вар. 68	Вар. 108	Вар. 148	Вар. 188	Вар. 228	Вар. 268	Вар. 308	Вар. 348	Вар. 388	Вар. 428
2-10 мкг/л	Вар. 29	Вар. 69	Вар. 109	Вар. 149	Вар. 189	Вар. 229	Вар. 269	Вар. 309	Вар. 349	Вар. 389	Вар. 429
1-6 мкг/л	Вар. 30	Вар. 70	Вар. 110	Вар. 150	Вар. 190	Вар. 230	Вар. 270	Вар. 310	Вар. 350	Вар. 390	Вар. 430
2-6 мкг/л	Вар. 31	Вар. 71	Вар. 111	Вар. 151	Вар. 191	Вар. 231	Вар. 271	Вар. 311	Вар. 351	Вар. 391	Вар. 431
3-6 мкг/л	Вар. 32	Вар. 72	Вар. 112	Вар. 152	Вар. 192	Вар. 232	Вар. 272	Вар. 312	Вар. 352	Вар. 392	Вар. 432
4-6 мкг/л	Вар. 33	Вар. 73	Вар. 113	Вар. 153	Вар. 193	Вар. 233	Вар. 273	Вар. 313	Вар. 353	Вар. 393	Вар. 433
1-5 мкг/л	Вар. 34	Вар. 74	Вар. 114	Вар. 154	Вар. 194	Вар. 234	Вар. 274	Вар. 314	Вар. 354	Вар. 394	Вар. 434
2-5 мкг/л	Вар. 35	Вар. 75	Вар. 115	Вар. 155	Вар. 195	Вар. 235	Вар. 275	Вар. 315	Вар. 355	Вар. 395	Вар. 435
3-5 мкг/л	Вар. 36	Вар. 76	Вар. 116	Вар. 156	Вар. 196	Вар. 236	Вар. 276	Вар. 316	Вар. 356	Вар. 396	Вар. 436
4-5 мкг/л	Вар. 37	Вар. 77	Вар. 117	Вар. 157	Вар. 197	Вар. 237	Вар. 277	Вар. 317	Вар. 357	Вар. 397	Вар. 437

1-4 мкг/л	Вар. 38	Вар. 78	Вар. 118	Вар. 158	Вар. 198	Вар. 238	Вар. 278	Вар. 318	Вар. 358	Вар. 398	Вар. 438
2-4 мкг/л	Вар. 39	Вар. 79	Вар. 119	Вар. 159	Вар. 199	Вар. 239	Вар. 279	Вар. 319	Вар. 359	Вар. 399	Вар. 439
3-4 мкг/л	Вар. 40	Вар. 80	Вар. 120	Вар. 160	Вар. 200	Вар. 240	Вар. 280	Вар. 320	Вар. 360	Вар. 400	Вар. 440

\*Н.О.=не определено

\*НБЧ= не более чем

\*ПММ=по меньшей мере

[0132] 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.

[0133] 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 rVWF или rA13, 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.

[0134] Согласно определенным вариантам реализации указанная культуральная среда содержит по меньшей мере один полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 мг/л 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 мг/л 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 мг/л 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 мг/л до 8 мг/л путресцина.

[0135] Согласно одному из вариантов реализации указанная культуральная среда содержит по меньшей мере один полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 мг/л 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 мг/л 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 мг/л 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 мг/л до 8 мг/л путресцина и комбинацию меди и аммония согласно любому из вариантов 1-440, приведенных в **табл. 1**.

[0136] 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.

[0137] Как правило, для добавления в среды согласно настоящему изобретению может применяться любая соль кальция; неограничивающие примеры приемлемых солей включают  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaFPO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaI}_2$ ,  $\text{CaBr}_2$ ,  $(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2\text{Ca}$ ,  $(\text{CHO}_2)_2\text{Ca}$ ,  $(\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6)_2\text{Ca}$ ,  $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2\text{Ca}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  и т.п. Согласно определенным вариантам реализации для добавления в культуральные среды согласно настоящему изобретению применяют фармацевтически приемлемую соль кальция.

[0138] Как правило, для добавления в среды согласно настоящему изобретению может применяться любая соль цинка; неограничивающие примеры приемлемых солей включают  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2\text{Zn}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnBr}_2$ ,  $\text{ZnBr}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Zn}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  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.

[0139] 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 настоящему 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.

[0140] 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.

[0141] 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.

[0142] 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**

[0143] 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 ристоцетин-кофакторной активностью, составляющей по меньшей мере приблизительно 30 МЕ/мкг.

[0144] 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 мМ, 8 мМ, 7 мМ, 6 мМ, 5 мМ, 4 мМ, 3 мМ, 2 мМ, 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).

[0145] 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.

[0146] 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 г/л, согласно другому варианту реализации - от приблизительно 2,4 мкг г/л до приблизительно 15 мкг г/л, согласно еще одному варианту реализации - от приблизительно 2,4 мкг г/л до приблизительно 10 мкг г/л, согласно еще одному варианту реализации - от приблизительно 2,4 мкг г/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.

[0147] 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)**

[0148] 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.

[0149] 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 мкг/л до 20 мкг/л меди. Согласно другому варианту реализации указанная среда содержит от 1 мкг/л до 6 мкг/л меди. Согласно другому варианту реализации указанная среда содержит от 2 мкг/л до 5 мкг/л меди. Согласно другому варианту реализации указанная среда содержит от 3 мкг/л до 4 мкг/л меди. Согласно другим вариантам реализации указанная среда содержит по меньшей мере 1 мкг/л меди, или по меньшей мере 2 мкг/л, 3 мкг/л, 4 мкг/л, 5 мкг/л, 6 мкг/л, 7 мкг/л, 8 мкг/л, 9 мкг/л, 10 мкг/л, 11 мкг/л, 12 мкг/л, 13 мкг/л, 14 мкг/л, 15 мкг/л, 16 мкг/л, 17 мкг/л, 18 мкг/л, 19 мкг/л, 20 мкг/л, либо более высокие концентрации меди.

[0150] 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 мМ, 8 мМ, 7 мМ, 6 мМ, 5 мМ, 4 мМ, 3 мМ, 2 мМ, 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).

[0151] 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 мкМ до 12 мкМ цинка. Согласно другому

варианту реализации указанная культуральная среда также содержит точно или приблизительно от 5 мкМ 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 мкМ, 4 мкМ, 5 мкМ, 6 мкМ, 7 мкМ, 8 мкМ, 9 мкМ, 10 мкМ, 11 мкМ, 12 мкМ, 13 мкМ, 14 мкМ, 15 мкМ, 20 мкМ, 25 мкМ, 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.

V.	VI.	Концентрация цинка										
		ПММ 2 мкМ	ПМ М 3 мкМ	ПМ М 4 мкМ	ПМ М 5 мкМ	ПМ М 6 мкМ	ПМ М 7 мкМ	ПМ М 8 мкМ	ПМ М 9 мкМ	ПМ М 10 мкМ	2- 12 мк М	5- 12 мк М
Концентрация меди	ПММ 1 мкг/л	Вар. 441	Вар. 481	Вар. 521	Вар. 561	Вар. 601	Вар. 641	Вар. 681	Вар. 721	Вар. 761	Вар. 801	Вар. 841
	ПММ 2 мкг/л	Вар. 442	Вар. 482	Вар. 522	Вар. 562	Вар. 602	Вар. 642	Вар. 682	Вар. 722	Вар. 762	Вар. 802	Вар. 842
	ПММ 3 мкг/л	Вар. 443	Вар. 483	Вар. 523	Вар. 563	Вар. 603	Вар. 643	Вар. 683	Вар. 723	Вар. 763	Вар. 803	Вар. 843
	ПММ 4 мкг/л	Вар. 444	Вар. 484	Вар. 524	Вар. 564	Вар. 604	Вар. 644	Вар. 684	Вар. 724	Вар. 764	Вар. 804	Вар. 844
	ПММ 5 мкг/л	Вар. 445	Вар. 485	Вар. 525	Вар. 565	Вар. 605	Вар. 645	Вар. 685	Вар. 725	Вар. 765	Вар. 805	Вар. 845
	ПММ 6 мкг/л	Вар. 446	Вар. 486	Вар. 526	Вар. 566	Вар. 606	Вар. 646	Вар. 686	Вар. 726	Вар. 766	Вар. 806	Вар. 846
	ПММ 7 мкг/л	Вар. 447	Вар. 487	Вар. 527	Вар. 567	Вар. 607	Вар. 647	Вар. 687	Вар. 727	Вар. 767	Вар. 807	Вар. 847
	ПММ 8 мкг/л	Вар. 448	Вар. 488	Вар. 528	Вар. 568	Вар. 608	Вар. 648	Вар. 688	Вар. 728	Вар. 768	Вар. 808	Вар. 848
	ПММ 9 мкг/л	Вар. 449	Вар. 489	Вар. 529	Вар. 569	Вар. 609	Вар. 649	Вар. 689	Вар. 729	Вар. 769	Вар. 809	Вар. 849
	ПММ 10 мкг/л	Вар. 450	Вар. 490	Вар. 530	Вар. 570	Вар. 610	Вар. 650	Вар. 690	Вар. 730	Вар. 770	Вар. 810	Вар. 850
	Приблизительно 1 мкг/л	Вар. 451	Вар. 491	Вар. 531	Вар. 571	Вар. 611	Вар. 651	Вар. 691	Вар. 731	Вар. 771	Вар. 811	Вар. 851
	Приблизительно 1.5 мкг/л	Вар. 452	Вар. 492	Вар. 532	Вар. 572	Вар. 612	Вар. 652	Вар. 692	Вар. 732	Вар. 772	Вар. 812	Вар. 852

Приблизительно 2 мкг/л	Вар. 453	Вар. 493	Вар. 533	Вар. 573	Вар. 613	Вар. 653	Вар. 693	Вар. 733	Вар. 773	Вар. 813	Вар. 853
Приблизительно 2.5 мкг/л	Вар. 454	Вар. 494	Вар. 534	Вар. 574	Вар. 614	Вар. 654	Вар. 694	Вар. 734	Вар. 774	Вар. 814	Вар. 854
Приблизительно 3 мкг/л	Вар. 455	Вар. 495	Вар. 535	Вар. 575	Вар. 615	Вар. 655	Вар. 695	Вар. 735	Вар. 775	Вар. 815	Вар. 855
Приблизительно 3,5 мкг/л	Вар. 456	Вар. 496	Вар. 536	Вар. 576	Вар. 616	Вар. 656	Вар. 696	Вар. 736	Вар. 776	Вар. 816	Вар. 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

[0152] 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 мМ, 8 мМ, 7 мМ, 6 мМ, 5 мМ, 4 мМ, 3 мМ, 2 мМ, 1 мМ, или менее, и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных 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 rA13).

[0153] 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 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 мМ 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 мМ; 0,8 мМ; 0,9 мМ; 1,0 мМ; 1,1 мМ; 1,2 мМ; 1,3 мМ; 1,4 мМ; 1,5 мМ; 1,6 мМ; 1,7 мМ; 1,8 мМ; 1,9 мМ; 2,0 мМ; 2,25 мМ; 2,5 мМ; 2,75 мМ; 3,0 мМ; 3,5 мМ; 4,0 мМ; 4,5 мМ; 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.

VII.	VIII.	Концентрация кальция										
		ПМ М 0,5 мМ	ПМ М 0,75 мМ	ПМ М 1,0 мМ	ПМ М 1,25 мМ	ПМ М 1,5 мМ	ПМ М 2,0 мМ	ПМ М 2,5 мМ	ПМ М 3,0 мМ	ПМ М 4 мМ	ПМ М 5 мМ	0,5- 1,5 мМ
Концентрация меди	ПММ 1 мкг/л	Вар. 881	Вар. 921	Вар. 961	Вар. 1001	Вар. 1041	Вар. 1081	Вар. 1121	Вар. 1161	Вар. 1201	Вар. 1241	Вар. 128 1
	ПММ 2 мкг/л	Вар. 882	Вар. 922	Вар. 962	Вар. 1002	Вар. 1042	Вар. 1082	Вар. 1122	Вар. 1162	Вар. 1202	Вар. 1242	Вар. 128 2
	ПММ 3 мкг/л	Вар. 883	Вар. 923	Вар. 963	Вар. 1003	Вар. 1043	Вар. 1083	Вар. 1123	Вар. 1163	Вар. 1203	Вар. 1243	Вар. 128 3
	ПММ 4 мкг/л	Вар. 884	Вар. 924	Вар. 964	Вар. 1004	Вар. 1044	Вар. 1084	Вар. 1124	Вар. 1164	Вар. 1204	Вар. 1244	Вар. 128 4
	ПММ 5 мкг/л	Вар. 885	Вар. 925	Вар. 965	Вар. 1005	Вар. 1045	Вар. 1085	Вар. 1125	Вар. 1165	Вар. 1205	Вар. 1245	Вар. 128 5
	ПММ 6 мкг/л	Вар. 886	Вар. 926	Вар. 966	Вар. 1006	Вар. 1046	Вар. 1086	Вар. 1126	Вар. 1166	Вар. 1206	Вар. 1246	Вар. 128 6
	ПММ 7 мкг/л	Вар. 887	Вар. 927	Вар. 967	Вар. 1007	Вар. 1047	Вар. 1087	Вар. 1127	Вар. 1167	Вар. 1207	Вар. 1247	Вар. 128 7
	ПММ 8 мкг/л	Вар. 888	Вар. 928	Вар. 968	Вар. 1008	Вар. 1048	Вар. 1088	Вар. 1128	Вар. 1168	Вар. 1208	Вар. 1248	Вар. 128 8
	ПММ 9 мкг/л	Вар. 889	Вар. 929	Вар. 969	Вар. 1009	Вар. 1049	Вар. 1089	Вар. 1129	Вар. 1169	Вар. 1209	Вар. 1249	Вар. 128 9
	ПММ 10 мкг/л	Вар. 890	Вар. 930	Вар. 970	Вар. 1010	Вар. 1050	Вар. 1090	Вар. 1130	Вар. 1170	Вар. 1210	Вар. 1250	Вар. 129 0
	Приблизительно 1 мкг/л	Вар. 891	Вар. 931	Вар. 971	Вар. 1011	Вар. 1051	Вар. 1091	Вар. 1131	Вар. 1171	Вар. 1211	Вар. 1251	Вар. 129 1
	Приблизительно 1,5 мкг/л	Вар. 892	Вар. 932	Вар. 972	Вар. 1012	Вар. 1052	Вар. 1092	Вар. 1132	Вар. 1172	Вар. 1212	Вар. 1252	Вар. 129 2
	Приблизительно 2 мкг/л	Вар. 893	Вар. 933	Вар. 973	Вар. 1013	Вар. 1053	Вар. 1093	Вар. 1133	Вар. 1173	Вар. 1213	Вар. 1253	Вар. 129 3

Приблизительно 2,5 мкг/л	Вар. 894	Вар. 934	Вар. 974	Вар. 1014	Вар. 1054	Вар. 1094	Вар. 1134	Вар. 1174	Вар. 1214	Вар. 1254	Вар. 1294
Приблизительно 3 мкг/л	Вар. 895	Вар. 935	Вар. 975	Вар. 1015	Вар. 1055	Вар. 1095	Вар. 1135	Вар. 1175	Вар. 1215	Вар. 1255	Вар. 1295
Приблизительно 3,5 мкг/л	Вар. 896	Вар. 936	Вар. 976	Вар. 1016	Вар. 1056	Вар. 1096	Вар. 1136	Вар. 1176	Вар. 1216	Вар. 1256	Вар. 1296
Приблизительно 4 мкг/л	Вар. 897	Вар. 937	Вар. 977	Вар. 1017	Вар. 1057	Вар. 1097	Вар. 1137	Вар. 1177	Вар. 1217	Вар. 1257	Вар. 1297
Приблизительно 4,5 мкг/л	Вар. 898	Вар. 938	Вар. 978	Вар. 1018	Вар. 1058	Вар. 1098	Вар. 1138	Вар. 1178	Вар. 1218	Вар. 1258	Вар. 1298
Приблизительно 5 мкг/л	Вар. 899	Вар. 939	Вар. 979	Вар. 1019	Вар. 1059	Вар. 1099	Вар. 1139	Вар. 1179	Вар. 1219	Вар. 1259	Вар. 1299
Приблизительно 5,5 мкг/л	Вар. 900	Вар. 940	Вар. 980	Вар. 1020	Вар. 1060	Вар. 1100	Вар. 1140	Вар. 1180	Вар. 1220	Вар. 1260	Вар. 1300
Приблизительно 6 мкг/л	Вар. 901	Вар. 941	Вар. 981	Вар. 1021	Вар. 1061	Вар. 1101	Вар. 1141	Вар. 1181	Вар. 1221	Вар. 1261	Вар. 1301
Приблизительно 7 мкг/л	Вар. 902	Вар. 942	Вар. 982	Вар. 1022	Вар. 1062	Вар. 1102	Вар. 1142	Вар. 1182	Вар. 1222	Вар. 1262	Вар. 1302
Приблизительно 8 мкг/л	Вар. 903	Вар. 943	Вар. 983	Вар. 1023	Вар. 1063	Вар. 1103	Вар. 1143	Вар. 1183	Вар. 1223	Вар. 1263	Вар. 1303
Приблизительно 9 мкг/л	Вар. 904	Вар. 944	Вар. 984	Вар. 1024	Вар. 1064	Вар. 1104	Вар. 1144	Вар. 1184	Вар. 1224	Вар. 1264	Вар. 1304
Приблизительно 10 мкг/л	Вар. 905	Вар. 945	Вар. 985	Вар. 1025	Вар. 1065	Вар. 1105	Вар. 1145	Вар. 1185	Вар. 1225	Вар. 1265	Вар. 1305
1-20 мкг/л	Вар. 906	Вар. 946	Вар. 986	Вар. 1026	Вар. 1066	Вар. 1106	Вар. 1146	Вар. 1186	Вар. 1226	Вар. 1266	Вар. 1306
2-20 мкг/л	Вар. 907	Вар. 947	Вар. 987	Вар. 1027	Вар. 1067	Вар. 1107	Вар. 1147	Вар. 1187	Вар. 1227	Вар. 1267	Вар. 1307
1-10 мкг/л	Вар. 908	Вар. 948	Вар. 988	Вар. 1028	Вар. 1068	Вар. 1108	Вар. 1148	Вар. 1188	Вар. 1228	Вар. 1268	Вар. 1308

2-10 мкг/л	Вар. 909	Вар. 949	Вар. 989	Вар. 1029	Вар. 1069	Вар. 1109	Вар. 1149	Вар. 1189	Вар. 1229	Вар. 1269	Вар. 1309
1-6 мкг/л	Вар. 910	Вар. 950	Вар. 990	Вар. 1030	Вар. 1070	Вар. 1110	Вар. 1150	Вар. 1190	Вар. 1230	Вар. 1270	Вар. 1310
2-6 мкг/л	Вар. 911	Вар. 951	Вар. 991	Вар. 1031	Вар. 1071	Вар. 1111	Вар. 1151	Вар. 1191	Вар. 1231	Вар. 1271	Вар. 1311
3-6 мкг/л	Вар. 912	Вар. 952	Вар. 992	Вар. 1032	Вар. 1072	Вар. 1112	Вар. 1152	Вар. 1192	Вар. 1232	Вар. 1272	Вар. 1312
4-6 мкг/л	Вар. 913	Вар. 953	Вар. 993	Вар. 1033	Вар. 1073	Вар. 1113	Вар. 1153	Вар. 1193	Вар. 1233	Вар. 1273	Вар. 1313
1-5 мкг/л	Вар. 914	Вар. 954	Вар. 994	Вар. 1034	Вар. 1074	Вар. 1114	Вар. 1154	Вар. 1194	Вар. 1234	Вар. 1274	Вар. 1314
2-5 мкг/л	Вар. 915	Вар. 955	Вар. 995	Вар. 1035	Вар. 1075	Вар. 1115	Вар. 1155	Вар. 1195	Вар. 1235	Вар. 1275	Вар. 1315
3-5 мкг/л	Вар. 916	Вар. 956	Вар. 996	Вар. 1036	Вар. 1076	Вар. 1116	Вар. 1156	Вар. 1196	Вар. 1236	Вар. 1276	Вар. 1316
4-5 мкг/л	Вар. 917	Вар. 957	Вар. 997	Вар. 1037	Вар. 1077	Вар. 1117	Вар. 1157	Вар. 1197	Вар. 1237	Вар. 1277	Вар. 1317
1-4 мкг/л	Вар. 918	Вар. 958	Вар. 998	Вар. 1038	Вар. 1078	Вар. 1118	Вар. 1158	Вар. 1198	Вар. 1238	Вар. 1278	Вар. 1318
2-4 мкг/л	Вар. 919	Вар. 959	Вар. 999	Вар. 1039	Вар. 1079	Вар. 1119	Вар. 1159	Вар. 1199	Вар. 1239	Вар. 1279	Вар. 1319
3-4 мкг/л	Вар. 920	Вар. 960	Вар. 1000	Вар. 1040	Вар. 1080	Вар. 1120	Вар. 1160	Вар. 1200	Вар. 1240	Вар. 1280	Вар. 1320

\*ПММ=по меньшей мере

[0154] 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 мМ, 8 мМ, 7 мМ, 6 мМ, 5 мМ, 4 мМ, 3 мМ, 2 мМ, 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 rA13).

[0155] 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 мМ 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 мМ; 0,7 мМ; 0,8 мМ; 0,9 мМ; 1,0 мМ; 1,1 мМ; 1,2 мМ; 1,3 мМ; 1,4 мМ; 1,5 мМ; 1,6 мМ; 1,7 мМ; 1,8 мМ; 1,9 мМ; 2,0 мМ; 2,25 мМ; 2,5 мМ; 2,75 мМ; 3,0 мМ; 3,5 мМ; 4,0 мМ; 4,5 мМ; 5,0 мМ или более, и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных в **табл. 2**.

[0156] 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 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 мг/л до 10 мг/л никотинамида (витамина В3). Согласно другим вариантам реализации указанная культуральная среда может содержать по меньшей мере точно или приблизительно 2 мг/л, 3 мг/л, 4 мг/л, 5 мг/л, 6 мг/л, 7 мг/л, 8 мг/л, 9 мг/л, 10 мг/л, 15 мг/л, 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.

IX.	X.	Концентрация кальция										
		ПММ 2 мг/мл	ПМ М 3 мг/м л	ПМ М 4 мг/м л	ПМ М 5 мг/м л	ПМ М 6 мг/м л	ПМ М 7 мг/м л	ПМ М 8 мг/м л	ПМ М 9 мг/м л	ПМ М 10 мг/м л	ПМ М 15 мг/м л	2-10 мг/м л
Концентрация меди	ПММ 1 мкг/л	Вар. 1321	Вар. 1361	Вар. 1401	Вар. 1441	Вар. 1481	Вар. 1521	Вар. 1561	Вар. 1601	Вар. 1641	Вар. 1681	Вар. 1721
	ПММ 2 мкг/л	Вар. 1322	Вар. 1362	Вар. 1402	Вар. 1442	Вар. 1482	Вар. 1522	Вар. 1562	Вар. 1602	Вар. 1642	Вар. 1682	Вар. 1722
	ПММ 3 мкг/л	Вар. 1323	Вар. 1363	Вар. 1403	Вар. 1443	Вар. 1483	Вар. 1523	Вар. 1563	Вар. 1603	Вар. 1643	Вар. 1683	Вар. 1723
	ПММ 4 мкг/л	Вар. 1324	Вар. 1364	Вар. 1404	Вар. 1444	Вар. 1484	Вар. 1524	Вар. 1564	Вар. 1604	Вар. 1644	Вар. 1684	Вар. 1724
	ПММ 5 мкг/л	Вар. 1325	Вар. 1365	Вар. 1405	Вар. 1445	Вар. 1485	Вар. 1525	Вар. 1565	Вар. 1605	Вар. 1645	Вар. 1685	Вар. 1725
	ПММ 6 мкг/л	Вар. 1326	Вар. 1366	Вар. 1406	Вар. 1446	Вар. 1486	Вар. 1526	Вар. 1566	Вар. 1606	Вар. 1646	Вар. 1686	Вар. 1726
	ПММ 7 мкг/л	Вар. 1327	Вар. 1367	Вар. 1407	Вар. 1447	Вар. 1487	Вар. 1527	Вар. 1567	Вар. 1607	Вар. 1647	Вар. 1687	Вар. 1727



1-4 мкг/л	Вар. 1358	Вар. 1398	Вар. 1438	Вар. 1478	Вар. 1518	Вар. 1558	Вар. 1598	Вар. 1638	Вар. 1678	Вар. 1718	Вар. 1758
2-4 мкг/л	Вар. 1359	Вар. 1399	Вар. 1439	Вар. 1479	Вар. 1519	Вар. 1559	Вар. 1599	Вар. 1639	Вар. 1679	Вар. 1719	Вар. 1759
3-4 мкг/л	Вар. 1360	Вар. 1400	Вар. 1440	Вар. 1480	Вар. 1520	Вар. 1560	Вар. 1600	Вар. 1640	Вар. 1680	Вар. 1720	Вар. 1760

\*ПММ=по меньшей мере

[0157] 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 мМ, 8 мМ, 7 мМ, 6 мМ, 5 мМ, 4 мМ, 3 мМ, 2 мМ, 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 rA13).

[0158] 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 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 никотинамид в концентрации от 2 мг/мл 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 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, 5 мг/мл, 6 мг/мл, 7 мг/мл, 8 мг/мл, 9 мг/мл, 10 мг/мл, 11 мг/мл, 12 мг/мл, 13 мг/мл, 14 мг/мл, 15 мг/мл или более, и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных в **табл. 2**.

[0159] 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 мМ, 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 мг/мл 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 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, 5 мг/мл, 6 мг/мл, 7 мг/мл, 8 мг/мл, 9 мг/мл, 10 мг/мл, 11 мг/мл, 12 мг/мл, 13 мг/мл, 14 мг/мл, 15 мг/мл или более, и медь и кальций в концентрациях согласно любому из вариантов 881-1320, приведенных в **табл. 3**.

**XI. Способы получения факторов крови с высокой удельной активностью**

## **А. Способы культивирования клеток**

[0160] Настоящее изобретение обеспечивает способы крупномасштабного производства рекомбинантных белков (таких как rVWF и rA13). Согласно определенным вариантам реализации в таких способах крупномасштабного производства применяют реакторы с мешалкой/перемешиванием для получения указанных терапевтических рекомбинантных белков.

[0161] 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 хеостатический 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.

[0162] 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, rADAMTS13) может быть выделен после сбора супернатанта периодической культуры. Согласно другим вариантам реализации рекомбинантный VWF может быть выделен после сбора супернатанта периодической культуры.

[0163] 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 хеостатическому и турбидостатическому методам извлеченная среда содержит клетки. Таким образом, клетки, остающиеся в сосуде для культивирования клеток, должны расти для поддержания стационарного состояния. Согласно хеостатическому 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 rVWF или rA13 выделяют после сбора супернатанта непрерывной культуры. Типовой способ непрерывного культивирования клеток описан в WO/2011/012725 (Grillberger et

a1.), содержание которой включено в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте для любых целей.

[0164] 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 rVWF или rA13 выделяют после сбора супернатанта перфузионной культуры.

[0165] 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.

[0166] 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.

[0167] Клетки, экспрессирующие vWF и/или rA13, 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 доращивать 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).

[0168] 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.

[0169] Согласно определенным вариантам реализации указанная культура может поддерживаться в течение по меньшей мере приблизительно 7 дней, или по меньшей мере приблизительно 14 дней, 21 дня, 28 дней, или по меньшей мере приблизительно 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, или по меньшей мере приблизительно 2 месяцев, 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 rA13, 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 rVWF или rA13. 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.

[0170] 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 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 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  $4,0 \times 10^6$  клеток/мл, в течение по меньшей мере 5 недель. Согласно еще одному более конкретному варианту реализации плотность клеток непрерывной клеточной культуры, предложенной согласно настоящему изобретению, поддерживают на уровне концентрации, не превышающей  $4,0 \times 10^6$

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  $4,0 \times 10^6$  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  $4,0 \times 10^6$  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  $4,0 \times 10^6$  клеток/мл, в течение по меньшей мере 9 недель.

[0171] Согласно одному из вариантов реализации плотность клеток непрерывной клеточной культуры, предложенной в соответствии с настоящим изобретением, поддерживают на уровне концентрации, не превышающей  $3,5 \times 10^6$  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  $3,5 \times 10^6$  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  $3,5 \times 10^6$  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  $3,5 \times 10^6$  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  $3,5 \times 10^6$  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  $3,5 \times 10^6$

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  $3,5 \times 10^6$  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  $3,5 \times 10^6$  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  $3,5 \times 10^6$  клеток/мл, в течение по меньшей мере 9 недель.

[0172] Согласно одному из вариантов реализации плотность клеток непрерывной клеточной культуры, предложенной в соответствии с настоящим изобретением, поддерживают на уровне концентрации, не превышающей  $3,0 \times 10^6$  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  $3,0 \times 10^6$  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  $3,0 \times 10^6$  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  $3,0 \times 10^6$  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  $3,0 \times 10^6$  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  $3,0 \times 10^6$

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  $3,0 \times 10^6$  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  $3,0 \times 10^6$  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  $3,0 \times 10^6$  клеток/мл, в течение по меньшей мере 9 недель.

[0173] Согласно одному из вариантов реализации плотность клеток непрерывной клеточной культуры, предложенной в соответствии с настоящим изобретением, поддерживают на уровне концентрации, не превышающей  $2,5 \times 10^6$  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  $2,5 \times 10^6$  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  $2,5 \times 10^6$  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  $2,5 \times 10^6$  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  $2,5 \times 10^6$  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  $2,5 \times 10^6$

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  $2,5 \times 10^6$  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  $2,5 \times 10^6$  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  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл, в течение по меньшей мере 9 недель.

[0174] Согласно другому варианту реализации плотность клеток непрерывной клеточной культуры, предложенной в соответствии с настоящим изобретением, поддерживают на уровне концентрации, не превышающей  $2,0 \times 10^6$  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  $2,0 \times 10^6$  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  $2,0 \times 10^6$  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  $2,0 \times 10^6$  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  $2,0 \times 10^6$  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  $2,0 \times 10^6$

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  $2,0 \times 10^6$  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  $2,0 \times 10^6$  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  $2,0 \times 10^6$  клеток/мл, в течение по меньшей мере 9 недель.

[0175] Согласно одному из вариантов 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 дней. Согласно 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 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.

[0176] 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**

[0177] 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 термины «культура клеток (клеточная культура)» и «раствор культуры клеток» применяют взаимозаменяемо.

[0178] 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; с) отбор 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 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 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.

[0179] 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 до конечной концентрации меди по меньшей мере 2,0 мкг/л; (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 указанный отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью rVWF, составляющей по меньшей мере 30 МЕ/мкг rVWF. Согласно одному из вариантов реализации раствор культуры клеток также содержит аммоний в концентрации менее чем 10 мМ. Согласно другому конкретному варианту реализации концентрация аммония в растворе культуры клеток поддерживают на уровне концентрации аммония, не превышающей 10 мМ, в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно

предпочтительному варианту реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации, не превышающей 5 мМ. Согласно другому конкретному варианту реализации концентрацию аммония в растворе культуры клеток поддерживают на уровне концентрации аммония, не превышающей 5 мМ, в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно предпочтительному варианту реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации, не превышающей 4 мМ. Согласно другому конкретному варианту реализации концентрацию аммония в культуре клеток поддерживают на уровне концентрации аммония, не превышающей 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 мМ, 7 мМ, 6 мМ, 5 мМ, 4 мМ, 3 мМ, 2 мМ, 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 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.

[0180] Согласно одному из вариантов реализации описанного выше способа в основные среды для клеточных культур добавляют медь до конечной концентрации меди по меньшей мере 2,4 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 растворе культуры клеток поддерживают на уровне концентрации аммония 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 растворе культуры клеток поддерживают на уровне концентрации аммония 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 мМ, 7 мМ, 6 мМ, 5 мМ, 4 мМ, 3 мМ, 2 мМ, 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.

[0181] Согласно одному из вариантов реализации описанного выше способа в основные среды для клеточных культур добавляют медь до конечной концентрации меди, составляющей по меньшей мере 3 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 растворе культуры клеток поддерживают на уровне концентрации аммония 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 растворе культуры клеток поддерживают на уровне концентрации аммония 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 мМ, 7 мМ, 6 мМ, 5 мМ, 4 мМ, 3 мМ, 2 мМ, 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.

[0182] Согласно одному из вариантов реализации описанного выше способа в основные среды для клеточных культур добавляют медь до конечной концентрации меди, составляющей по меньшей мере 4 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 растворе культуры клеток поддерживают на уровне концентрации аммония 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 растворе культуры клеток поддерживают на уровне концентрации аммония не выше 4 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно другим вариантам реализации среды для клеточных культур содержат аммоний в концентрации не выше 10 мМ, или не выше 9 мМ, 8 мМ, 7 мМ, 6 мМ, 5 мМ, 4 мМ, 3 мМ, 2 мМ, 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.

[0183] Согласно одному из вариантов реализации описанного выше способа в основные среды для клеточных культур добавляют

медь до конечной концентрации меди, составляющей приблизительно 4,3 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 растворе культуры клеток поддерживают на уровне концентрации аммония 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 растворе культуры клеток поддерживают на уровне концентрации аммония 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 мМ, 7 мМ, 6 мМ, 5 мМ, 4 мМ, 3 мМ, 2 мМ, 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 ристоцетинкофакторной активностью rVWF, составляющей по меньшей мере 50 мЕ/мкг rVWF. Согласно более предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетинкофакторной активностью rVWF, составляющей по меньшей мере 70 мЕ/мкг rVWF.

[0184] Согласно одному из вариантов реализации описанного выше способа в основные среды для клеточных культур добавляют медь до конечной концентрации меди от 2 мкг/л до 20 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 растворе культуры клеток поддерживают на уровне концентрации аммония 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 мМ, 8 мМ, 7 мМ, 6 мМ, 5 мМ, 4 мМ, 3 мМ, 2 мМ, 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 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.

[0185] Согласно одному из вариантов реализации описанного выше способа в основные среды для клеточных культур добавляют медь до конечной концентрации меди от 3 мкг/л до 10 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 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 мМ, 7 мМ, 6 мМ, 5 мМ, 4 мМ, 3 мМ, 2 мМ, 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.

[0186] Согласно одному из вариантов реализации описанного выше способа в основные среды для клеточных культур добавляют медь до конечной концентрации меди от 4 мкг/л 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 мМ, 8 мМ, 7 мМ, 6 мМ, 5 мМ, 4 мМ, 3 мМ, 2 мМ, 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 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.

[0187] 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.

[0188] 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.

[0189] 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 rVWF, составляющей по меньшей мере 70 МЕ/мкг rVWF.

[0190] 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 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.

[0191] 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 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.

[0192] 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 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.

[0193] 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 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.

[0194] 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 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.

[0195] 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 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.

[0196] 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 до конечной концентрации меди, составляющей по меньшей мере 2,0 мкг/л; (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; (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 rVWF, и при этом указанный отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью rVWF, составляющей по меньшей мере 30 МЕ/мкг rVWF. Согласно определенным вариантам реализации конечная концентрация меди в дополненных основных культуральных средах составляет по меньшей мере 2,4 мкг/л, 3 мкг/л, 4 мкг/л, 5 мкг/л, 6 мкг/л, 7 мкг/л, 8 мкг/л, 9 мкг/л, 10 мкг/л, 15 мкг/л, 20 мкг/л или более. Согласно другим вариантам реализации конечная концентрация меди в дополненных основных культуральных средах составляет 2-20 мкг/л, 2-10 мкг/л, 3-8 мкг/л или 4-6 мкг/л. 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.

[0197] Согласно одному из вариантов реализации описанного выше способа культуральный супернатант, содержащий аммоний в концентрации более чем 6 мМ, не используют для получения композиции rVWF. Согласно определенным вариантам реализации конечная концентрация меди в дополненных основных культуральных средах составляет по меньшей мере 2,4 мкг/л, 3 мкг/л, 4 мкг/л, 5 мкг/л, 6 мкг/л, 7 мкг/л, 8 мкг/л, 9 мкг/л, 10 мкг/л, 15 мкг/л, 20 мкг/л или более. Согласно другим вариантам реализации конечная концентрация меди в дополненных основных культуральных средах составляет 2-20 мкг/л, 2-10 мкг/л, 3-8 мкг/л, или 4-6 мкг/л. 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.

[0198] Согласно одному из вариантов реализации описанного выше способа культуральный супернатант, содержащий аммоний в концентрации более чем 5 мМ, не используют для получения композиции rVWF. Согласно определенным вариантам реализации конечная концентрация меди в дополненных основных культуральных средах составляет по меньшей мере 2,4 мкг/л, 3 мкг/л, 4 мкг/л, 5 мкг/л, 6 мкг/л, 7 мкг/л, 8 мкг/л, 9 мкг/л, 10 мкг/л, 15 мкг/л, 20 мкг/л или более. Согласно другим вариантам реализации

конечная концентрация меди в дополненных основных культуральных средах составляет 2-20 мкг/л, 2-10 мкг/л, 3-8 мкг/л, или 4-6 мкг/л. 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.

[0199] Согласно одному из вариантов реализации описанного выше способа культуральный супернатант, содержащий аммоний в концентрации более чем 4 мМ, не используют для получения композиции rVWF. Согласно определенным вариантам реализации конечная концентрация меди в дополненных основных культуральных средах составляет по меньшей мере 2,4 мкг/л, 3 мкг/л, 4 мкг/л, 5 мкг/л, 6 мкг/л, 7 мкг/л, 8 мкг/л, 9 мкг/л, 10 мкг/л, 15 мкг/л, 20 мкг/л или более. Согласно другим вариантам реализации конечная концентрация меди в дополненных основных культуральных средах составляет 2-20 мкг/л, 2-10 мкг/л, 3-8 мкг/л, или 4-6 мкг/л. 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.

[0200] 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 NepG2; 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.

[0201] 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.

[0202] 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, 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  $\beta$ -актин. Типовой вектор для экспрессии rVWF 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.

[0203] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего 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 процессинга белков, маркеры отбора и т.п., которые общеизвестны специалистам в данной области техники.

[0204] 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.

[0205] 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.

[0206] 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)**

[0207] 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.

[0208] 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 FRETС-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день (т.е. 1500 единиц FRETС-VWF73 активности в день на литр культуры клеток; Р FRETС). Согласно определенным вариантам реализации конечная концентрация меди в дополненных основных культуральных средах составляет по меньшей мере 2 мкг/л, 3 мкг/л, 4 мкг/л, 5 мкг/л, 6 мкг/л или более. Согласно другим вариантам реализации конечная концентрация меди в дополненных основных культуральных средах составляет 1-6 мкг/л, 2-5 мкг/л, 2-4 мкг/л или 3-4 мкг/л. Согласно предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2000 единиц активности FRETС-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 FRETС-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 FRET5-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно определенным вариантам реализации указанные способы обеспечивают устойчивое увеличение объемной продуктивности FRET5-VWF73 (P FRET5). Например, согласно определенным вариантам реализации выделяют по меньшей мере 1500 единиц активности FRET5-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 FRET5-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 FRET5-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 FRET5-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 rA13 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.

[0209] Согласно одному варианту реализации описанных выше способов отделенный супернатант содержит по меньшей мере 4 единиц активности FRET5-VWF73 на мл супернатанта (FRET5). Согласно предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант содержит по меньшей мере 6 единиц активности FRET5-VWF73 на мл супернатанта. Согласно более предпочтительному

варианту реализации отделенный супернатант содержит по меньшей мере 8 единиц активности FRETС-VWF73 на мл супернатанта. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант содержит по меньшей мере 10 единиц активности FRETС-VWF73 на мл супернатанта. Согласно определенным вариантам реализации указанные способы обеспечивают устойчивое увеличение продуктивности FRETС. Например, согласно определенным вариантам реализации супернатант, обладающий по меньшей мере 4 единицами активности FRETС-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 FRETС-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 FRETС-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 FRETС-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.

[0210] Согласно одному варианту реализации описанных выше способов культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 800 мЕ FRETС-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 FRETС-VWF73 активности на  $10^6$  клеток культуры в день. Согласно более предпочтительному варианту реализации культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 1,2 Е FRETС-VWF73 активности на  $10^6$  клеток культуры в день. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 1,4 Е FRETС-VWF73 активности на  $10^6$  клеток культуры в день. Согласно определенным вариантам реализации указанные способы обеспечивают устойчивое увеличение удельной продуктивности FRETС-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.

[0211] Согласно одному варианту реализации описанных выше способов культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 1 мг rA13, согласно ИФА-анализу, на литр культуры в день (Р ELISA). Согласно предпочтительному варианту реализации культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 1,5 мг rA13, согласно ИФА-анализу, на литр культуры в день. Согласно более предпочтительному варианту реализации культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 2 мг rA13, согласно ИФА-анализу, на литр культуры в день. Согласно определенным вариантам реализации указанные способы обеспечивают устойчивое увеличение выработки rA13. Например, согласно определенным вариантам реализации культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 1 мг rA13, 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 rA13, 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 rA13, 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.

[0212] Согласно одному варианту реализации описанных выше способов культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 0,5 мкг rA13, 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 rA13, 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 rA13, 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 rA13, 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 rA13, 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 rA13, 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.

[0213] Согласно одному варианту реализации описанных выше способов отделенный супернатант содержит по меньшей мере 3 мкг rA13, согласно ИФА-анализу, на мл супернатанта. Согласно предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант содержит по меньшей мере 4 мкг rA13, согласно ИФА-анализу, на мл супернатанта. Согласно более предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант содержит по меньшей мере 5 мкг rA13, согласно ИФА-анализу, на мл супернатанта. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант содержит по меньшей мере 6 мкг rA13, согласно ИФА-анализу, на мл супернатанта. Согласно определенным вариантам реализации указанные способы обеспечивают устойчивое увеличение выработки rA13. Например, согласно определенным вариантам реализации супернатант, обладающий по меньшей мере 3 мкг rA13 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 rA13 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 rA13 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 rA13 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.

[0214] 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 мМ, 8 мМ, 7 мМ, 6 мМ, 5 мМ, 4 мМ, 3 мМ, 2 мМ, 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 rA13). Согласно конкретному варианту реализации культуральный раствор содержит медь и аммоний в концентрации согласно любому из вариантов 1-440, приведенных в **табл. 1**.

[0215] Согласно одному из вариантов реализации настоящее 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 цинка; (с) 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 (е) отделения по меньшей мере части указанного культурального супернатанта, при этом в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 1500 единиц активности FRETС-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 мкМ до 12 мкМ цинка. Согласно другому варианту реализации указанная культуральная среда также содержит точно или приблизительно от 5 мкМ 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 мкМ, 4 мкМ, 5 мкМ, 6 мкМ, 7 мкМ, 8 мкМ, 9 мкМ, 10 мкМ, 11 мкМ, 12 мкМ, 13 мкМ, 14 мкМ, 15 мкМ, 20 мкМ, 25 мкМ, 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 FRETС-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 FRETС-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 FRETС-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день.

[0216] Согласно одному из вариантов реализации настоящее 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 кальция; (с) 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 (е) отделения по меньшей мере части указанного культурального супернатанта, при этом в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 1500 единиц активности FRETС-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 мМ 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 мМ; 0,8 мМ; 0,9 мМ; 1,0 мМ; 1,1 мМ; 1,2 мМ; 1,3 мМ; 1,4 мМ; 1,5 мМ; 1,6 мМ; 1,7 мМ; 1,8 мМ; 1,9 мМ; 2,0 мМ; 2,25 мМ; 2,5 мМ; 2,75 мМ; 3,0 мМ; 3,5 мМ; 4,0 мМ; 4,5 мМ; 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**. Согласно предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2000 единиц активности FRETС-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 FRETС-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 FRETС-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день.

[0217] Согласно одному из вариантов реализации настоящее 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, цинка и кальция; (с) 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 (е) отделения по меньшей мере части указанного культурального супернатанта, при этом в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 1500 единиц активности FRETС-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 мМ 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 мМ; 0,7 мМ; 0,8 мМ; 0,9 мМ; 1,0 мМ; 1,1 мМ; 1,2 мМ; 1,3 мМ; 1,4 мМ; 1,5 мМ; 1,6 мМ; 1,7 мМ; 1,8 мМ; 1,9 мМ; 2,0 мМ; 2,25 мМ; 2,5 мМ; 2,75 мМ; 3,0 мМ; 3,5 мМ; 4,0 мМ; 4,5 мМ; 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 FRETС-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 FRETС-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 FRETС-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день.

[0218] Согласно одному из вариантов реализации настоящее изобретение обеспечивает способ получения композиции рекомбинантного ADAMTС13 (rA13); указанный способ включает этапы: (а) обеспечения основных сред для культуры клеток; (b) добавления в основные среды для клеточных культур меди и никотинамида; (с) 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 (е) отделения по меньшей мере части указанного культурального супернатанта, при этом в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 1500 единиц активности FRETС-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 мг/л до 10 мг/л никотинамида (витамина В3). Согласно другим вариантам реализации указанная культуральная среда может содержать по меньшей мере точно или приблизительно 2 мг/л, 3 мг/л, 4 мг/л, 5 мг/л, 6 мг/л, 7 мг/л, 8 мг/л, 9 мг/л, 10 мг/л, 15 мг/л, 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 FRETС-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 FRETС-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 FRETС-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день.

[0219] Согласно одному из вариантов реализации настоящее 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, цинка и никотинамида; (с) 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 (е) отделения по меньшей мере части указанного культурального супернатанта, при этом в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 1500 единиц активности FRETС-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 mM, 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 мг/мл 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 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, 5 мг/мл, 6 мг/мл, 7 мг/мл, 8 мг/мл, 9 мг/мл, 10 мг/мл, 11 мг/мл, 12 мг/мл, 13 мг/мл, 14 мг/мл, 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 FRETС-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 FRETС-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 FRETС-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день.

[0220] Согласно одному из вариантов реализации настоящее 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, кальция и никотинамида; (с) 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 (е) отделения по меньшей мере части указанного культурального супернатанта, причем в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 1500 единиц активности FRETС-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 mM, 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 мг/мл 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 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, 5 мг/мл,

6 мг/мл, 7 мг/мл, 8 мг/мл, 9 мг/мл, 10 мг/мл, 11 мг/мл, 12 мг/мл, 13 мг/мл, 14 мг/мл, 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 FRETС-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 FRETС-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 FRETС-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день.

[0221] 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, ВНК, SK-Nер, и НерG2; 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, ВНК 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, мышинового гена dhfr) и отбором при росте в присутствии возрастающих уровней метотрексата.

[0222] 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 литрах,

предпочтительно по меньшей мере в 100 литрах), 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 (ВНК, 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 марьшши (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 ВНК.

[0223] 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.

[0224] 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 (НТ) 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.*, Immuo Aktiengesellschaft).

[0225] Согласно другому предпочтительному варианту реализации стабильные HEK293 клетки получают, трансфицируя их конструкцией, содержащей селективируемый маркер устойчивости к гигромицину, и отбирая трансформанты по устойчивости к антибиотик.

[0226] 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.

[0227] 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):535-546, 1992)).

[0228] 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 Top Microbiol 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.

[0229] 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 лентивирусный 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).

[0230] 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, recA, 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  $\beta$ -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.

[0231] 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.

## **XII. Конкретные варианты реализации**

### **A. Рекомбинантный фактор фон Виллебранда (rVWF)**

[0232] Рекомбинантный 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 рекомбинантный 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 мМ) 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.

[0233] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к условиям культивирования клеток для получения рекомбинантного 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.

[0234] Согласно одному из аспектов настоящее изобретение обеспечивает раствор культуры клеток для получения высокомолекулярного рекомбинантного 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 мМ; и множество клеток, экспрессирующих высокомультимерный белок vWF, причем указанный белок vWF обладает удельной ристоцетиновой активностью, составляющей по меньшей мере приблизительно 30 МЕ/мкг.

[0235] Согласно одному из конкретных вариантов реализации описанных выше культур клеток раствор культуры клеток содержит средовую добавку, содержащую медь.

[0236] Согласно одному из конкретных вариантов реализации описанных выше культур клеток указанная средовая добавка содержит гидролизат, необязательно - соевый гидролизат.

[0237] Согласно одному из конкретных вариантов реализации описанных выше культур клеток указанная средовая добавка содержит соль меди, хелат меди или их комбинации.

[0238] 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.

[0239] Согласно одному из конкретных вариантов реализации описанных выше культур клеток концентрация меди составляет по меньшей мере приблизительно 4 мкг/л.

[0240] Согласно одному из конкретных вариантов реализации описанных выше культур клеток концентрация меди составляет от приблизительно 2,4 мкг/л до приблизительно 20 мкг/л.

[0241] Согласно одному из конкретных вариантов реализации описанных выше культур клеток белок vWF содержит от приблизительно 14 до приблизительно 22 димеров.

[0242] 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.

[0243] Согласно одному из конкретных вариантов реализации описанных выше способов указанные клетки представляют собой клетки млекопитающих.

[0244] Согласно одному из конкретных вариантов реализации описанных выше способов указанные клетки взяты из непрерывной клеточной линии.

[0245] Согласно одному из конкретных вариантов реализации описанных выше способов указанные клетки представляют собой клетки CHO.

[0246] Согласно одному из конкретных вариантов реализации описанных выше способов концентрация меди составляет по меньшей мере приблизительно 4 мкг/л.

[0247] Согласно одному из конкретных вариантов реализации описанных выше способов концентрация меди составляет от приблизительно от 2,4 мкг/л до приблизительно 20 мкг/л.

[0248] 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.

[0249] 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.

[0250] Согласно одному из конкретных вариантов реализации описанных выше способов рекомбинантный белок vWF содержит приблизительно 14 до приблизительно 22 димеров.

[0251] 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.

[0252] 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.

[0253] 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.

[0254] Согласно одному из конкретных вариантов реализации вышеописанных композиций rVWF рекомбинантный белок vWF содержит приблизительно от 14 до приблизительно 22 димеров.

[0255] 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.

[0256] 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 изобретению 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.

[0257] 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.

[0258] Согласно другому аспекту настоящее изобретение включает способ получения высокомолекулярного рекомбинантного vWF, включающий а) обеспечение культуры клеток; б) введение последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей vWF; с) отбор 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 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 14 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.

[0259] Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение охватывает высокомолекулярный рекомбинантный vWF, получаемый с помощью процесса, включающего этапы: а) обеспечения культуры клеток; б) введения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей vWF; в) 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.

[0260] 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.

[0261] 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.

[0262] 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 СНО.

[0263] 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 содержит от

2,4 мкг/л 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.

[0264] Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций указанная культура клеток представляет собой периодическую культуру.

[0265] Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций указанная культура клеток представляет собой непрерывную культуру. Согласно конкретному варианту реализации указанное непрерывное культивирование производится в хеMOSTатическом режиме. Согласно другому конкретному варианту реализации указанное непрерывное культивирование производится в режиме перфузии.

[0266] Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций уровень  $\text{NH}_4^+$  в указанной культуре поддерживают на уровне концентрации ниже 4 мМ.

[0267] Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций плотность клеток в культуре поддерживают на уровне менее чем  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл.

[0268] Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций плотность клеток в культуре поддерживают на уровне менее чем  $2,0 \times 10^6$  клеток/мл.

[0269] Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций указанную культуру поддерживают на уровне менее чем  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл.

[0270] 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.

[0271] 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.

[0272] Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций указанную композицию лиофилизируют.

[0273] 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.

[0274] 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.

[0275] 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.

[0276] 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)**

[0277] Белки ADAMTS (*т.е.* ADAMTS-1-ADAMTS-20) представляют собой семейство секретируемых цинковых 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).

[0278] 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 7С 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); тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ADAMTS-13); и антитромбоз/инсульт (ADAMTS18) (для ознакомления см. Lin and Liu, *Open Access Rheumatology Research and Reviews* 2009:1 121-131).

[0279] 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 FRETС-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.

[0280] 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.

[0281] Согласно одному из аспектов в соответствии с настоящим изобретением предложена композиция, содержащая рекомбинантный ADAMTS13 (rA13), обладающий удельной FRETС-VWF активностью, составляющей по меньшей мере 1600 МЕ/мкг.

[0282] Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций указанный rA13 обладает удельной FRETС-VWF активностью, составляющей по меньшей мере 800 МЕ/мкг.

[0283] 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 СНО.

[0284] 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 содержит от 2 мкг/л до 20 мкг/л меди.

[0285] 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.

[0286] Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций указанная культура клеток представляет собой периодическую культуру.

[0287] 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.

[0288] Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций уровень  $\text{NH}_4^+$  в указанной культуре поддерживают на уровне концентрации ниже 5 мМ.

[0289] Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций уровень  $\text{NH}_4^+$  в указанной культуре поддерживают на уровне концентрации ниже 4 мМ.

[0290] 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 конкретному 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.

[0291] 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.

[0292] Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций указанную композицию лиофилизируют.

### **XIII. Составы**

[0293] Согласно одному аспекту состава, содержащие рекомбинантные терапевтические белки rVWF или rA13 согласно настоящему изобретению, лиофилизируют перед введением. Лиофилизация 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)] .

[0294] 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 объемообразующего агента, регулирующего осмолярность агента и ПАВ, каждый из которых соответствует приведенному в настоящей заявке описанию, к указанной смеси перед лиофилизацией. Лиофилизованный состав состоит, согласно одному аспекту, по меньшей мере из чего-либо одного или более из: буфера, объемообразующего 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.

[0295] Стандартный способ восстановления лиофилизованного 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.

[0296] Лيوфилизированный 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-еноксидетанолом, 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-гидроксibenзоат.

[0297] 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.

[0298] Указанные фармацевтические составы вводят внутривенно, перорально, местно, трансдермально, парентерально, путем ингаляции, вагинально, ректально или путем внутривенной инъекции. Используемый в настоящей заявке термин «парентеральный» включает подкожные инъекции, внутривенные, внутримышечные, интракостеральные инъекции или инфузионные техники. Также включено введение путем внутривенной, внутрикожной, внутримышечной, интрамаммарной, 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.

[0299] 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.

[0300] Согласно одному аспекту составы согласно настоящему изобретению вводят сначала в виде болюса, 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, 18th 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.

#### **XIV. Способы лечения**

[0301] 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.

[0302] 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.

[0303] 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.

[0304] Неограничивающими примерами расстройств, связанных с образованием и/или присутствием одного или более тромба, являются наследственная тромбоцитическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП), приобретенная ТТП, артериальный тромбоз, острый инфаркт миокарда (ОИМ), инсульт, сепсис и диссеминированное внутрисосудистое свертывание (ДВС).

[0305] Неограничивающие примеры расстройств, связанных с инфарктом, включают без ограничения инфаркт 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.

#### **XV. Примеры**

[0306] Настоящее изобретение будет также проиллюстрировано следующими примерами, не ограничиваясь ими.

##### *Пример 1*

[0307] Эксперименты с непрерывной культурой клеток проводили с применением культуры рекомбинантной клеточной линии СНО, 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.

[0308] 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 хеостатические 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

[0309] 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

XVI. Среда BAV-SP	
Компоненты	мг/л
<b>Аминокислоты</b>	
L-Аланин	4,45
L-Аргинин HCl	147,50

L-Аспарагин-Н <sub>2</sub> O	30,21
L-Аспарагиновая кислота	6,65
L-Цистеин HCl-Н <sub>2</sub> O	32,55
L-Цистин 2HCl	57,35
L-Глутаминовая кислота	7,35
Глицин	18,75
L-Гистидин-Н <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>Витамин</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 ( $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ )	0,050
Сульфат железа ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0,417
Хлорид магния ( $\text{MgCl}_2$ )	28,640
Сульфат магния ( $\text{MgSO}_4$ )	48,840
Хлорид калия ( $\text{KCl}$ )	311,800
Хлорид натрия ( $\text{NaCl}$ )	6995,500
Фосфат натрия ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	71,020
Фосфат натрия ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	62,500
Гептагидрат сульфата цинка ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0,432
Селенит натрия	0,0131
<b>Другие</b>	
D-Глюкоза	3151
Линолевая кислота	0,042
Липоевая кислота	0,105
Путресцин $2\text{HCl}$	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
Synperonic F68	250,000
Бикарбонат натрия ( $\text{NaHCO}_3$ )	2000,000
Соевый пептон	4000,00
<b>Общий состав</b>	18596,8

[0310] 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 пересеивали 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 концентрация аммония также отслеживали ежедневно (кроме дней периодического культивирования 3 и 4).

[0311] 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 **табл. 8**). Например, на 4 день периодического культивирования культура клеток, росшая при высоких концентрациях меди, имела 1,52 МЕ rVWF активности/мл, по сравнению с 0,2 МЕ 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/10мкг rVWF к 62 МЕ/10мкг rVWF).

[0312] Как видно из **табл. 7** и **табл. 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 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 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-ый день периодического культивирования присутствовала низкая относительно концентрации низкомолекулярных видов rVWF концентрация высокомолекулярного rVWF, и также что указанная относительная концентрация снижалась с течением времени (Фиг. 1A и 1B). 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. 1А); 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%).

[0313] 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 день периодического культивирования (7 день культивирования) снижался относительно концентрации низкомолекулярных мультимеров rVWF. Также только на 5 день периодического культивирования (образец «дня 7» культуры в полосе 11) относительное количество vWF, состоящего из более чем 10 димеров, снижается до 21,4%.

[0314] 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 [10Е6 клеток/мл]	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> [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 rVWF в культурах клеток млекопитающих, культивируемых в периодическом режиме с применением BAV-SP сред с высокой концентрацией меди (4,3 мкг/л).

день периодического культивирования	Количество клеток [10Е6 клеток/мл]	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> [мг/л]	Жизнеспособность [%]	vWF ELISA [мкг/мл]	Ристоцетин [МЕ/мл]	Удельная активность 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*

[0315] Рекombинантный фактор VIII (rFVIII) и фактор фон Виллебранда (rVWF) коэкспрессировали в непрерывных культурах клеток GD8/6, эксплуатируемых в хеостатических 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 rVWF 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  $\text{Cu}^{2+}$ , 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 ( $2,8 \times 10^6$  клеток/мл), так и при низкой (прибл.  $1,4 \times 10^6$  клеток/мл) плотности клеток.

[0316] Как и ранее, образцы указанного культурального супернатанта исследовали на rVWF 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 хеMOSTАТИЧЕСКОЙ культуры (табл. 9–13).

**Таблица 9.** Средние данные по экспрессии rVWF в хеMOSTАТИЧЕСКОЙ культуре клеток на протяжении недель 2 и 3.

<b>XVII.</b> Количество клеток	<b>XVIII.</b> Концентрация меди	<b>XIX.</b> Количество клеток [10E6 клеток/мл]	<b>XX.</b> NH4+ <b>XXI.</b> [mM]	<b>XXII.</b> Жизнеспособность <b>XXIII.</b> [%]	<b>XXIV.</b> vWF ELISA [мкг/мл]	<b>XXV.</b> Ристоцетин [ME/мл]	<b>XXVI.</b> удельная активность [ME/ 10мкг]
XXVII. большое	XXVIII. низкая	<b>XXIX.</b> 2,88	<b>XXX.</b> 3,88	<b>XXXI.</b> 97,74	<b>XXXII.</b> 44,56	<b>XXXIII.</b> 0,10	<b>XXXIV.</b> 21,62
XXXV. большое	XXXVI. высокая	<b>XXXVII.</b> 2,79	<b>XXXVI</b> II. 4,04	<b>XXXIX.</b> 98,25	<b>XL.</b> 38,38	<b>XLI.</b> 0,19	<b>XLII.</b> 53,11
XLIII. маленькое	XLIV. низкая	<b>XLV.</b> 1,55	<b>XLVI.</b> 3,33	<b>XLVII.</b> 98,63	<b>XLVIII.</b> 18,96	<b>XLIX.</b> 0,10	<b>L.</b> 50,16
LI. маленькое	LII. высокая	<b>LIII.</b> 1,43	<b>LIV.</b> 3,17	<b>LV.</b> 98,59	<b>LVI.</b> 11,76	<b>LVII.</b> 0,70	<b>LVIII.</b> 598,76

**Таблица 10.** Экспрессия rVWF в хеMOSTАТИЧЕСКОЙ культуре клеток в условиях большого количества клеток и низкого уровня меди на протяжении недель 2 и 3.

<b>LIX.</b> День	<b>LX.</b> Количество клеток [10E6 клеток/мл]	<b>LXI.</b> NH4+ <b>LXII.</b> [mM]	<b>LXIII.</b> Жизнеспособность <b>LXIV.</b> [%]	<b>LXV.</b> vWF ELISA [мкг/мл]	<b>LXVI.</b> Ристоцетин [ME/мл]	<b>LXVII.</b> удельная активность [ME/10мкг]
------------------	---	---------------------------------------	---	--------------------------------------	---------------------------------------	---

LXVIII. 8	LXIX. 2,54	LXX. 3,7	LXXI. 98,20	LXXII. 39,8	LXXIII. 0,095	LXXIV. 23,86934673
LXXV. 9	LXXVI. 3,02	LXXVII. 4,2	LXXVIII. 97,40	LXXIX.	LXXX.	LXXXI.
LXXXII. 10	LXXXIII. 2,97	LXXXIV. 3,9	LXXXV. 97,90	LXXXVI. 41,3	LXXXVII. 0,095	LXXXVIII. 23,00242131
LXXXIX. 11	XC. 2,78	XCI.	XCII.	XCIII.	XCIV.	XCV.
XCVI. 13	XCVII. 2,91	XCVIII. 3,8	XCIX. 97,60	C. 41,7	CI. 0,095	CII. 22,78177458
CIII. 14	CIV. 2,90	CV. 3,8	CVI. 97,40	CVII.	CVIII.	CIX.
CX. 15	CXI. 3,05	CXII. 3,9	CXIII. 97,70	CXIV. 44,7	CXV. 0,095	CXVI. 21,25279642
CXVII. 16	CXVIII. 2,99	CXIX. 3,8	CXX. 98,30	CXXI.	CXXII.	CXXIII.
CXXIV. 17	CXXV. 2,76	CXXVI. 3,9	CXXVII. 97,40	CXXVIII. 55,3	CXXIX. 0,095	CXXX. 17,17902351
CXXXI.	<b>CXXXII. 2,88</b>	<b>CXXXIII. 3,88</b>	<b>CXXXIV. 97,74</b>	<b>CXXXV. 44,56</b>	<b>CXXXVI. 0,10</b>	<b>CXXXVII. 21,62</b>

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

<b>CXXXVIII. День</b>	<b>CXXXIX. Количество клеток [10Е6 клеток/мл]</b>	<b>CXL. NH4+ CXLI. [mM]</b>	<b>CXLII. Жизнеспосо бность CXLIII. [%]</b>	<b>CXLIV. vWF ELISA [мкг/мл]</b>	<b>CXLV. Ристоцетин [МЕ/мл]</b>	<b>CXLVI. удельная активность [МЕ/10мкг]</b>
CXLVII. 8	CXLVIII. 2,52	CXLIX. 3,9	CL. 98,30	CLI. 31,8	CLII. 0,35	CLIII. 110,0628931
CLIV. 9	CLV. 2,92	CLVI. 4,3	CLVII. 98,50	CLVIII.	CLIX.	CLX.
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 [10Е6 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 [10Е6 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>

[0317] 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  $\text{NH}_4^+$  концентрации, чем культуры, продуцирующие rVWF с низкой удельной активностью. Эти данные также подтверждают корреляцию между концентрацией  $\text{NH}_4^+$  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.

[0318] 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, эксплуатируемых при высоком содержании меди и низкой плотности клеток и, таким образом, низком содержании аммония, обеспечивали устойчивую экспрессию высокомульимерного 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

[0319] Для определения эффекта концентрации меди в культуральной среде на экспрессию и удельную активность rA13 культуры клеток млекопитающих для экспрессии rA13 культивировали в течение 4 недель в условиях хеостатической 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 rA13, полученного на литр культуры в день, и общей активности полученного rA13 на клетку в день, соответственно.

Таблица 14. Состав среды для получения ADAMTS13

CLXI. DMEM/F12 BESP845	
Аминокислоты	мг/л

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 (CaCl <sub>2</sub> )	116,6000
Сульфат меди (CuSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O)	0,0026
Нитрат железа (Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> -9H <sub>2</sub> O)	0,0500
Сульфат железа (FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O)	1,0170
Хлорид магния (MgCl <sub>2</sub> )	28,6400
Сульфат магния (MgSO <sub>4</sub> )	48,8400
Хлорид калия (KCl)	311,8000
Хлорид натрия (NaCl)	5495,5000
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Безводный	213,0200
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Безводный	54,3500
Гептагидрат сульфата цинка (ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O)	0,4320
Селенит натрия, безводный	0,0087

<b>Витамин</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
ZnSo4*7 H2O	1,0000
Na-Гидрокарбонат	1500,0000
<b>Всего добавок</b>	<b>3802,5</b>
<b>Общее количество ингредиентов</b>	<b>16540,8</b>

[0320] Чтобы определить, влияют ли повышенные концентрации меди на сохранность экспрессируемого rA13, супернатант, собранный от rA13-культур клеток, выращенных в среде, содержащей 0,66 мкг/л, 1 мкг/л и 4 мкг/л меди, исследовали с помощью анализа ДСН-ПААГ. Как видно из Фиг. 3А (окрашивание серебром) и

Фиг. 3В (анти-rA13 вестерн-блоттинг), очевидных изменений в качестве продукта при гель-электрофорезе не наблюдается. Так, экспрессия rA13 в присутствии повышенных концентраций меди не приводит к повышению уровня усеченного 170 кДа или других низкомолекулярных вариантов rA13, и к появлению дополнительных или увеличению полос, соответствующих НСР (белкам клеток-хозяев).

[0321] При расчете оптимальной концентрации меди для активности rA13 экстраполирование данных из **табл. 15** о зависимости P 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 rA13 в культурах клеток млекопитающих при хеостатическом режиме непрерывного культивирования с применением среды содержащей различные концентрации меди.

Объем 10 л R&D (НИР) эксперимент Среднее за 4 недели CST	ZZ - NC	P Frets	q Frets	Уд. активность
	[10E6 клеток/мл]	[E/(л*д)]	[E/(10E9 клетки* 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

[0322] На основании полученных результатов, описанных выше, был проведен дополнительный эксперимент для сравнения экспрессии rA13 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 rA13, полученного на литр культуры в день и общей активности rA13, полученного на клетку в день, соответственно, на протяжении 8 недель. Конкретные данные для каждой недели выработки rA13 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 rA13.

**Таблица 16.** Экспрессия rA13 в культурах клеток млекопитающих при хеостатическом режиме непрерывного культивирования с применением среды, содержащей различные концентрации меди.

Объем 10 л Среднее за 8 недель CST	ZZ - NC	P Frets	q Frets	Уд. активность
	[10E6 кл./мл]	[E/(л*д)]	[E/(10E9 кл.*д)]	E/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

[0323] 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 композиции рекомбинантного ADAMTS13, включающий стадии:

культивирование одной или более клеток млекопитающего, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный ADAMTS13 белок в среде культуры клеток, содержащей от 1 мкг/л до 4 мкг/л меди и от 2 мкМ до 12 мкМ цинка, таким образом, что рекомбинантный ADAMTS13 экспрессировался и выделялся из клеток млекопитающего в культуральный супернатант; и

отделение по меньшей мере части культурального супернатанта,

причем в указанном отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 1500 единиц активности FRET5-VWF73 на литр среды культуры клеток в день.

2. Способ по п. 1, где среда культуры клеток содержит от 2 мкг/л до 4 мкг/л меди.

3. Способ по п. 1, где среда культуры клеток содержит от 1,3 мкг/л до 3 мкг/л меди.

4. Способ по п. 1, где среда культуры клеток содержит 4 мкг/л меди.

5. Способ по любому из пп.1-4, где среда культуры клеток содержит от 5 мкМ до 12 мкМ цинка.

6. Способ по любому из пп.1-5, где среда культуры клеток дополнительно содержит по меньшей мере 7 мг/мл никотинамида.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где плотность клеток поддерживают на уровне менее чем  $4,0 \times 10^6$  клеток на мл, менее чем  $3,5 \times 10^6$  клеток на мл или менее чем  $3,0 \times 10^6$  клеток на мл в ходе стадии культивирования одной или более клеток млекопитающего.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где культивирование одной или более клеток млекопитающего включает непрерывное культивирование клеток млекопитающего.

9. Способ по п. 8, где непрерывное культивирование клеток млекопитающего осуществляют в хеостатическом режиме.

10. Способ по п. 8, где непрерывное культивирование клеток млекопитающего осуществляют в режиме перфузии.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где клетки млекопитающего представляют собой CHO клетки.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где рекомбинантный ADAMTS13 белок представляет собой рекомбинантный ADAMTS13 белок человека.

13. Способ по любому из пп. 1-12, где в указанном отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2000 единиц активности FRETС-VWF73 на литр среды культуры клеток в день.

14. Способ по любому из пп. 1-12, где в указанном отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2500 единиц активности FRETС-VWF73 на литр среды культуры клеток в день.

15. Супернатант культуры клеток, содержащий рекомбинантный ADAMTS13, где супернатант получают способом по любому из пп. 1-14.

16. Композиция рекомбинантного ADAMTS13 для введения субъекту, нуждающемуся в ней, полученная способом по любому из пп. 1-14.

17. Композиция по п. 16 для лечения нарушения, связанного с формированием и/или присутствием тромбов.

18. Композиция по п. 17, где нарушением является тромботическая тромбоцитопеническая пурпура.

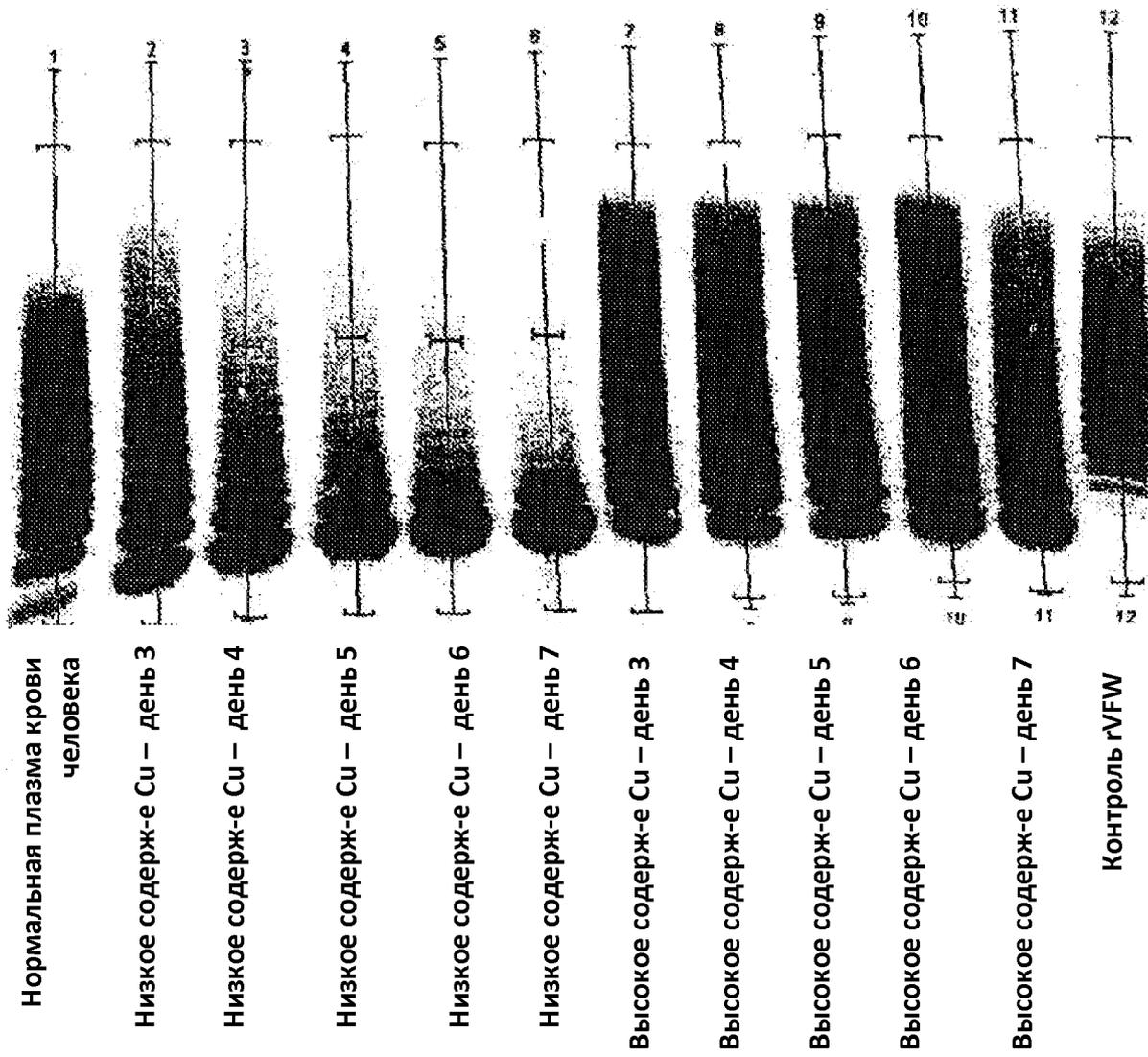
19. Композиция по п. 17, где нарушением является инфаркт.

20. Композиция по п. 17, где нарушением является инсульт.

21. Композиция по любому из пп. 17-20, где композиция составлена для внутривенного введения.

По доверенности

Фиг. 1А

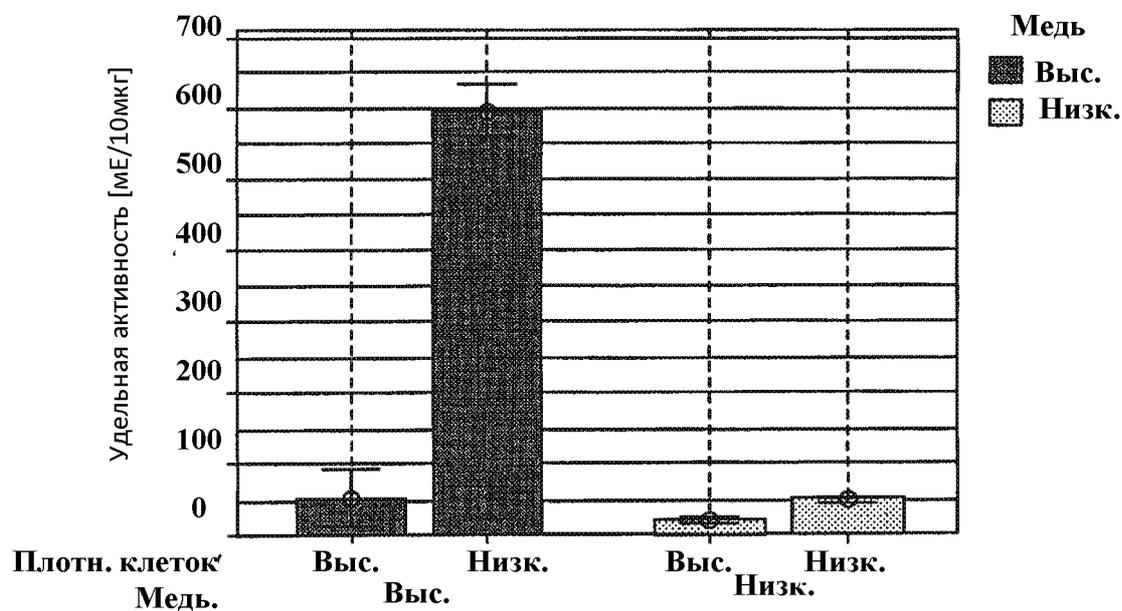


**Фиг. 1В**

<b>Номер полосы</b>	<b>Номер зоны</b>	<b>Примеси Int ×mm</b>	<b>Относит. кол-во</b>
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

Интервальный график удельной активности [mE/10мкг]

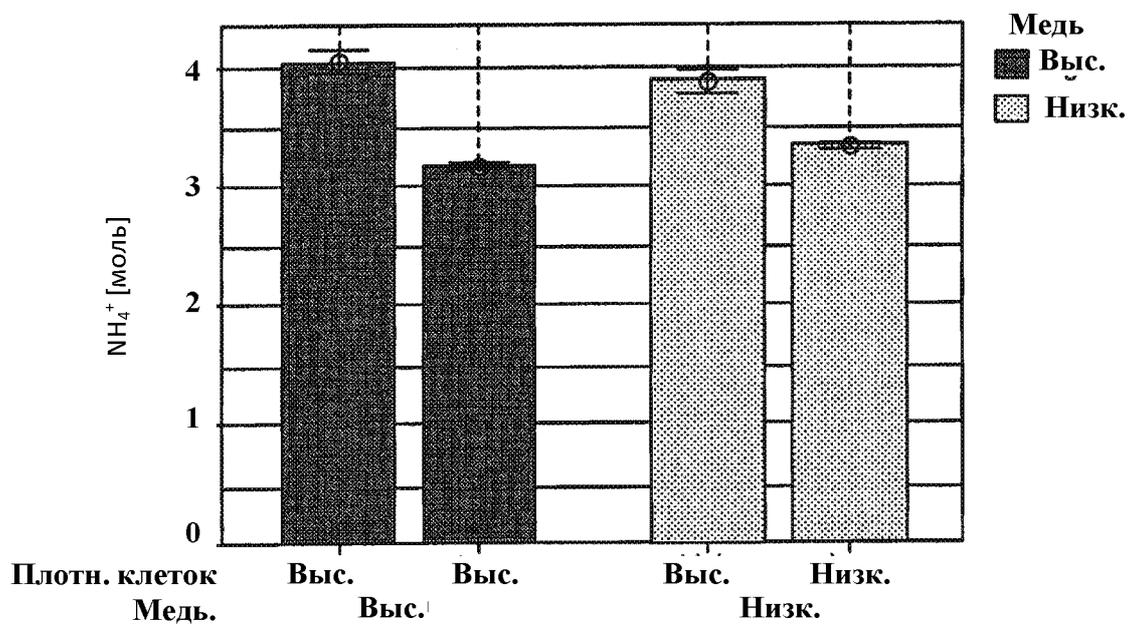
90% CL для среднего



Фиг. 2А

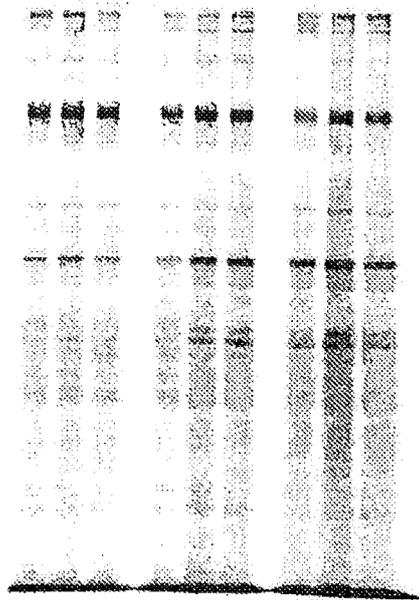
Интервальный график  $\text{NH}_4^+$  [ммоль/г]

90% CL для среднего



Фиг. 2В

4 мкг/л 1 мкг/л 0,66 мкг/л



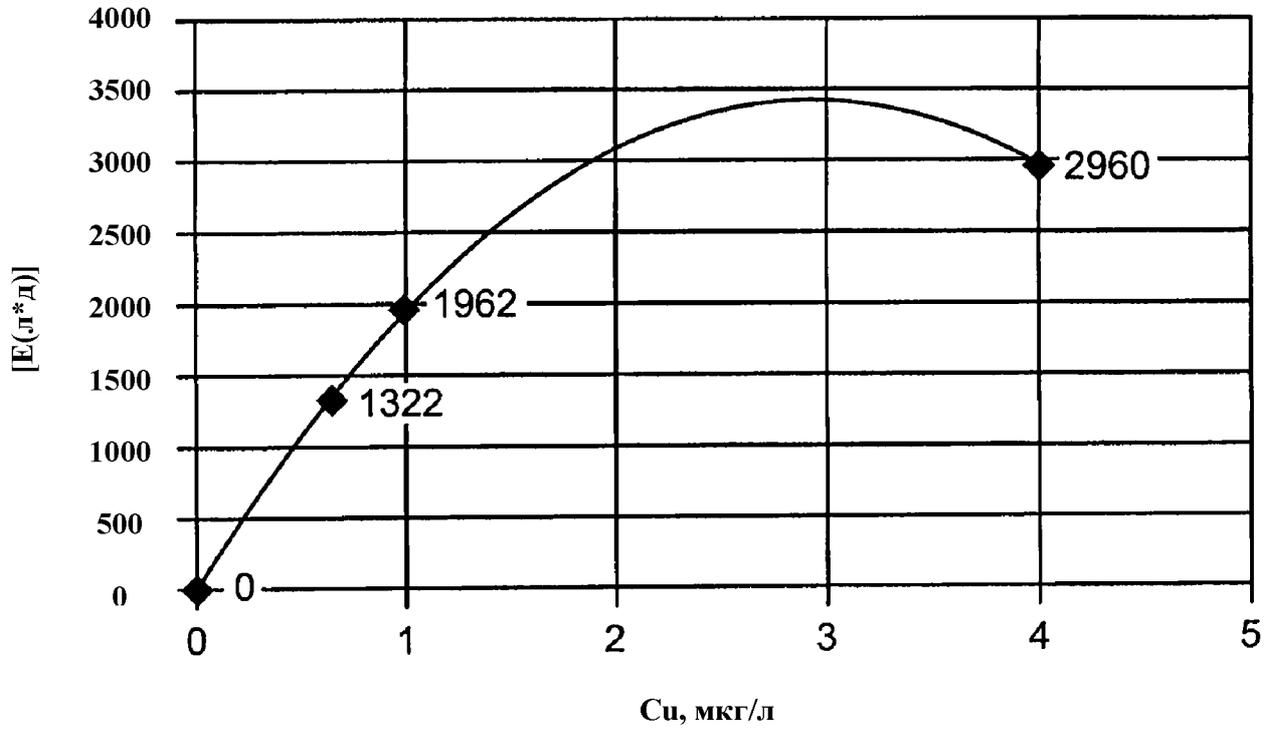
Фиг. 3А

4 мкг/л 1 мкг/л 0,66 мкг/л



Фиг. 3В

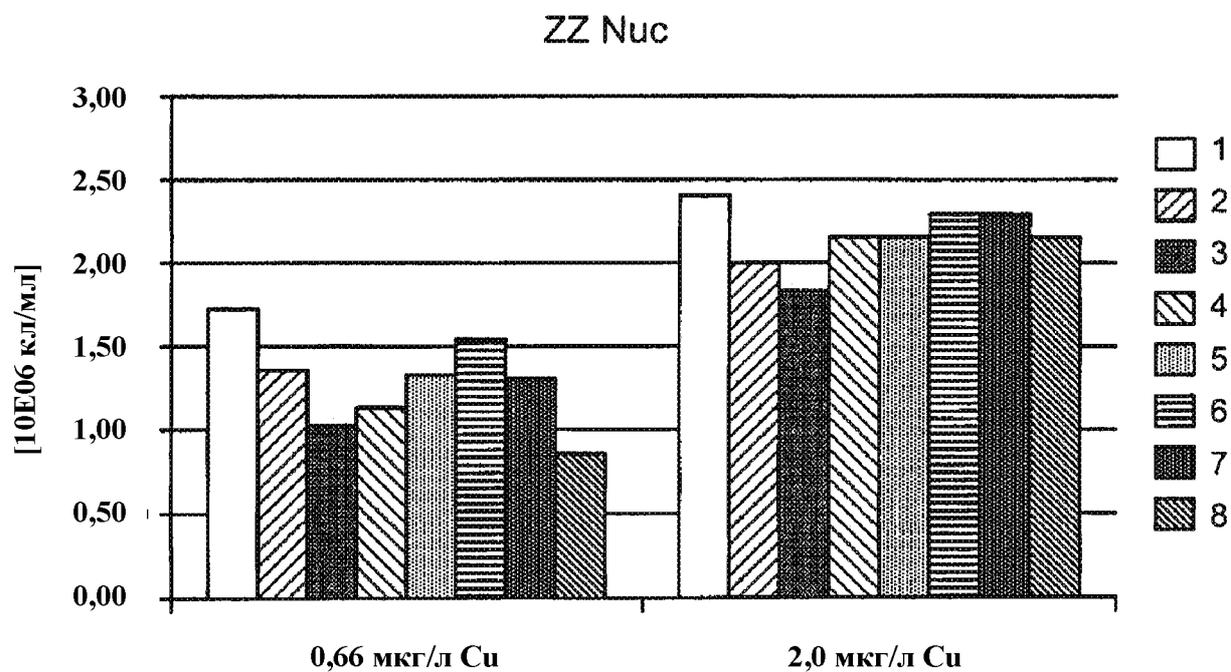
## Р Frets/Медь



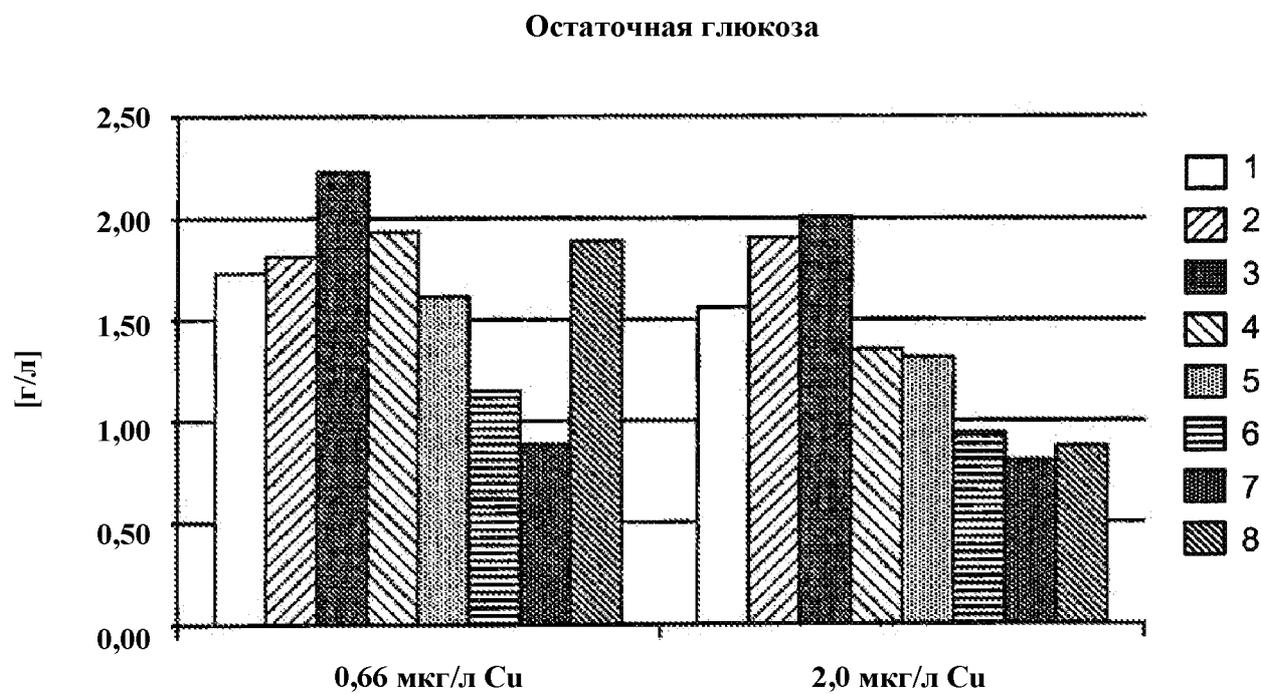
$$y = -400,37x^2 + 2344,5x - 11,267$$
$$R^2 = 0,9994$$

- ◆ среднее по 4-м неделям CST
- Poly. (среднее по 4 нед. CST)

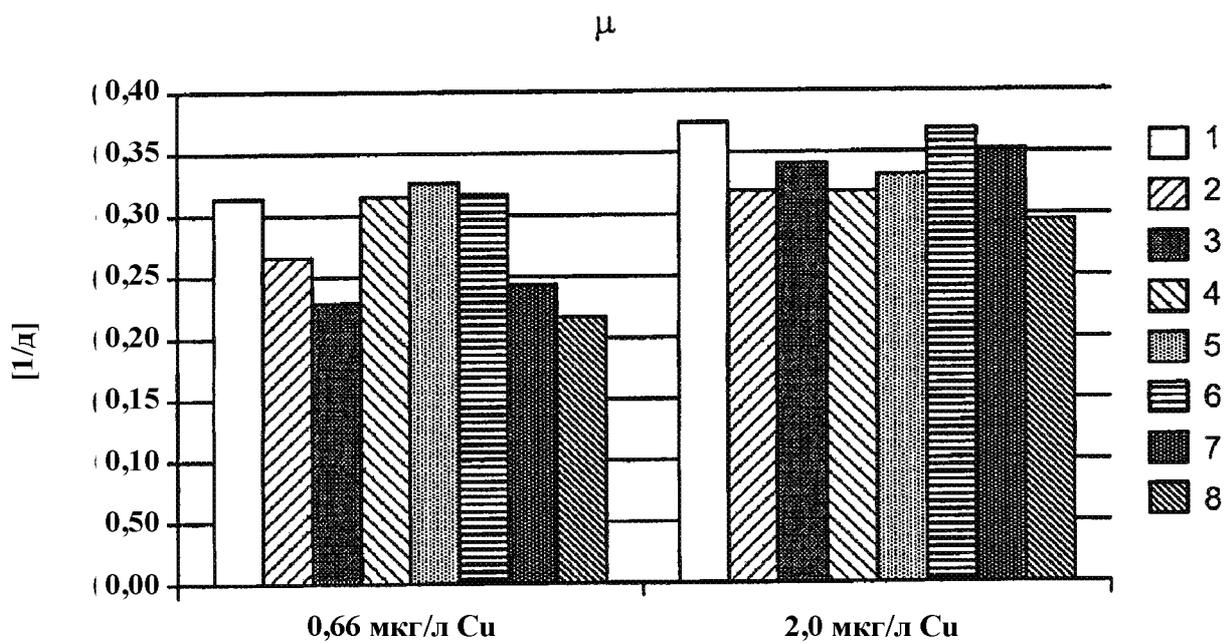
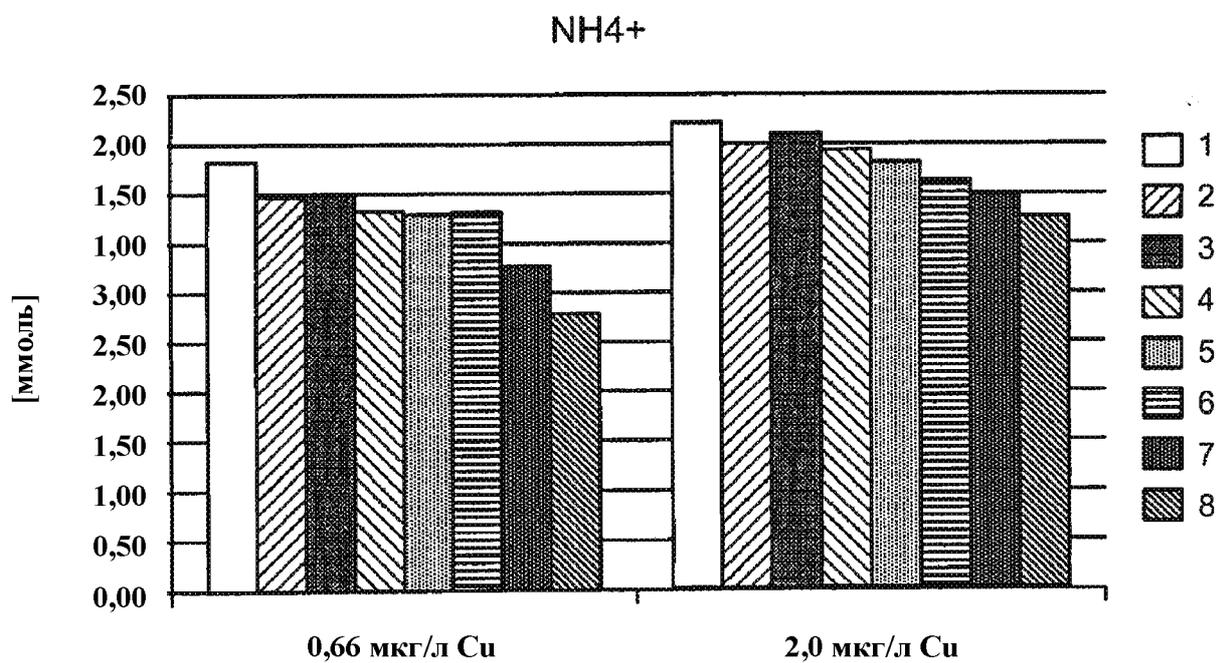
Фиг. 4



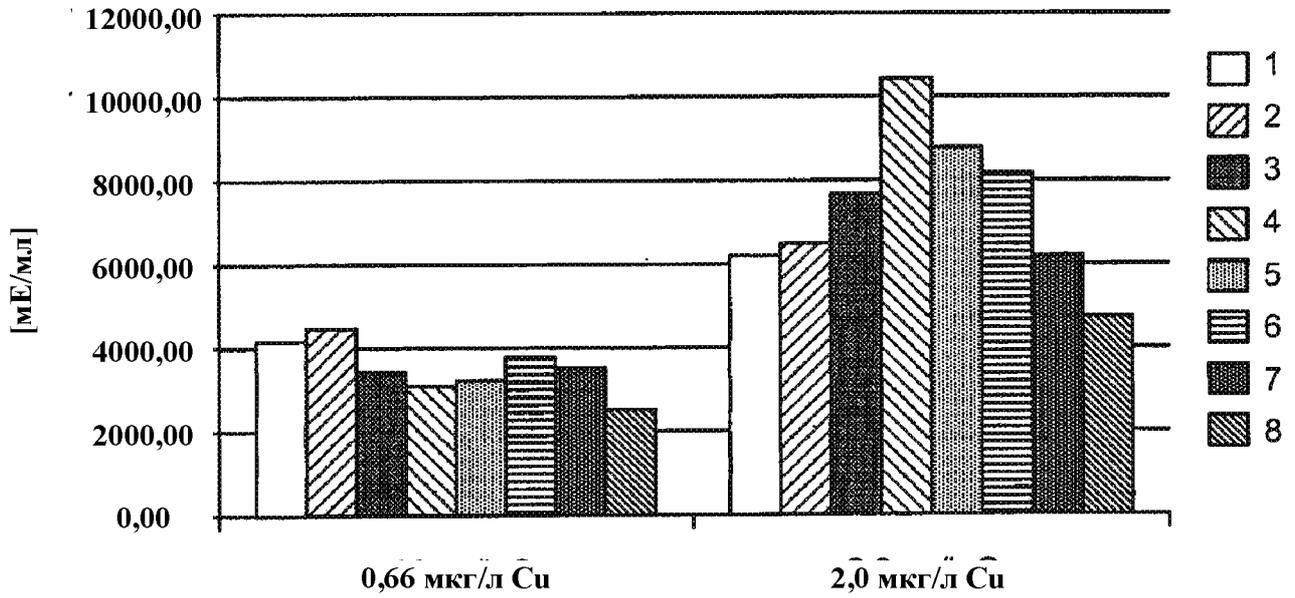
Фиг. 5А



Фиг. 5В

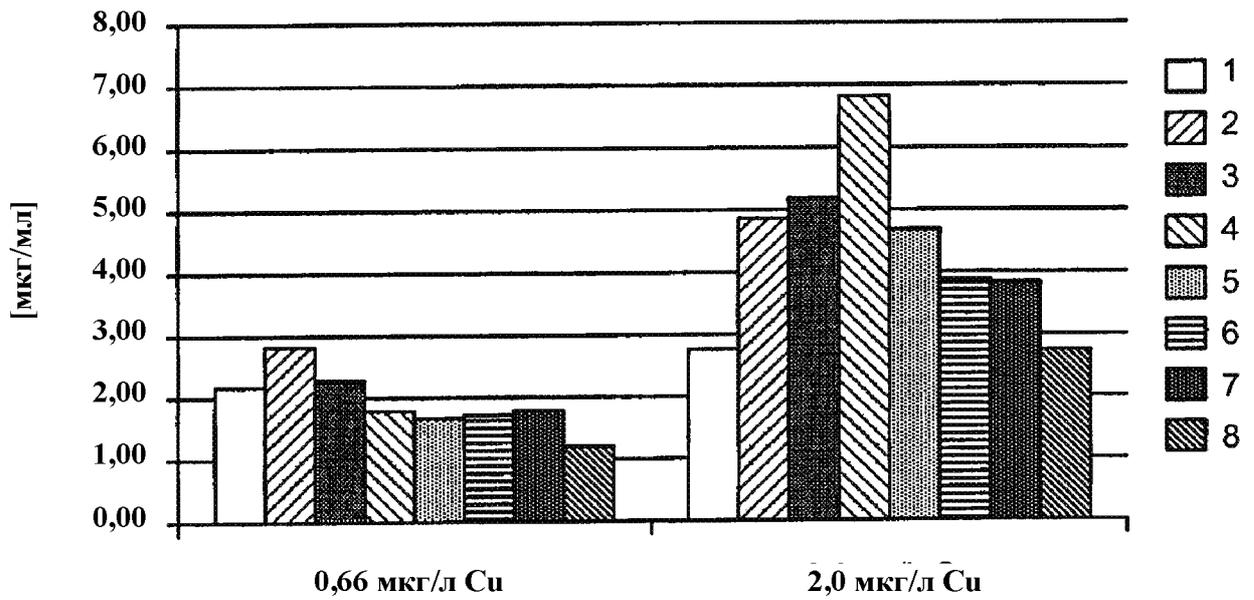


A13 Frets



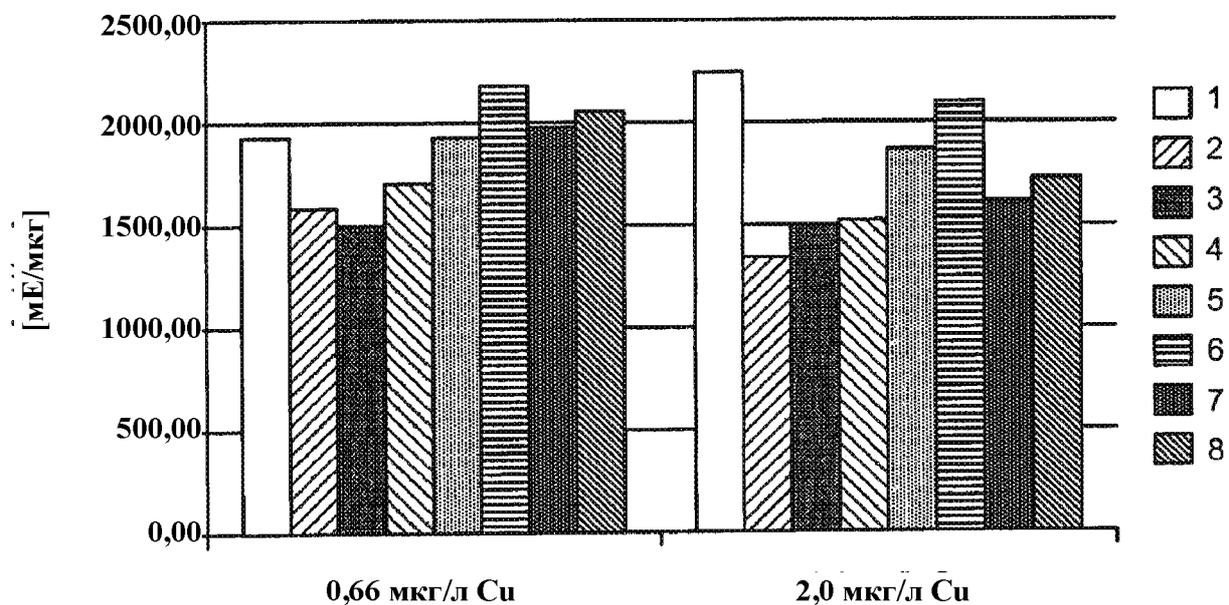
Фиг. 5E

A13 Elisa



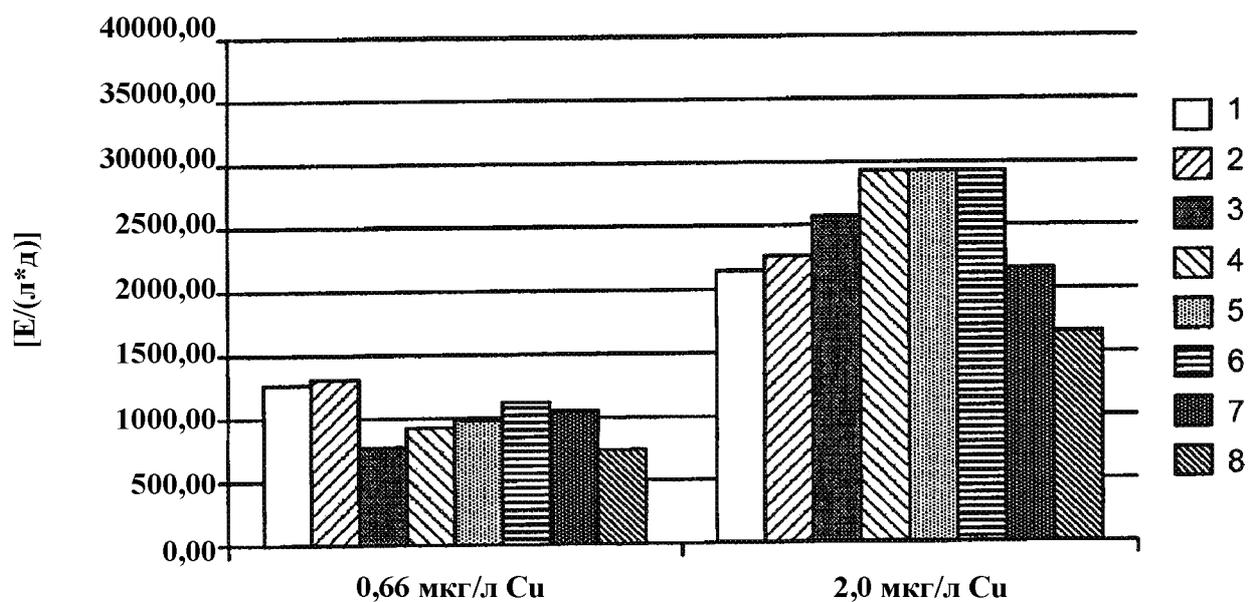
Фиг. 5F

## Удельная активность

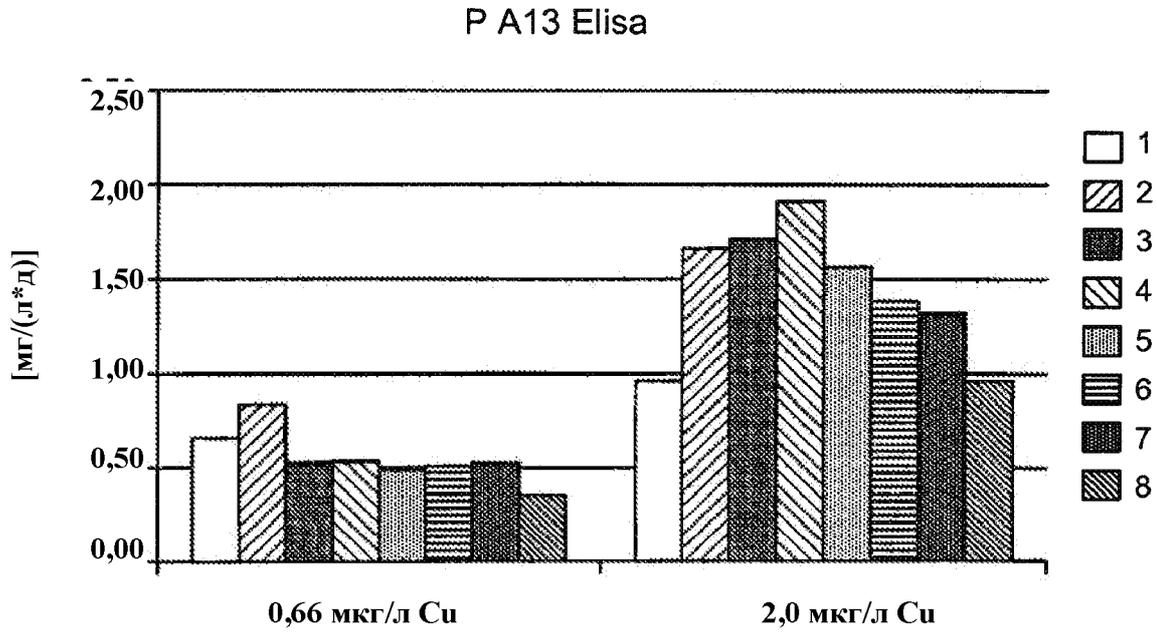


Фиг. 5G

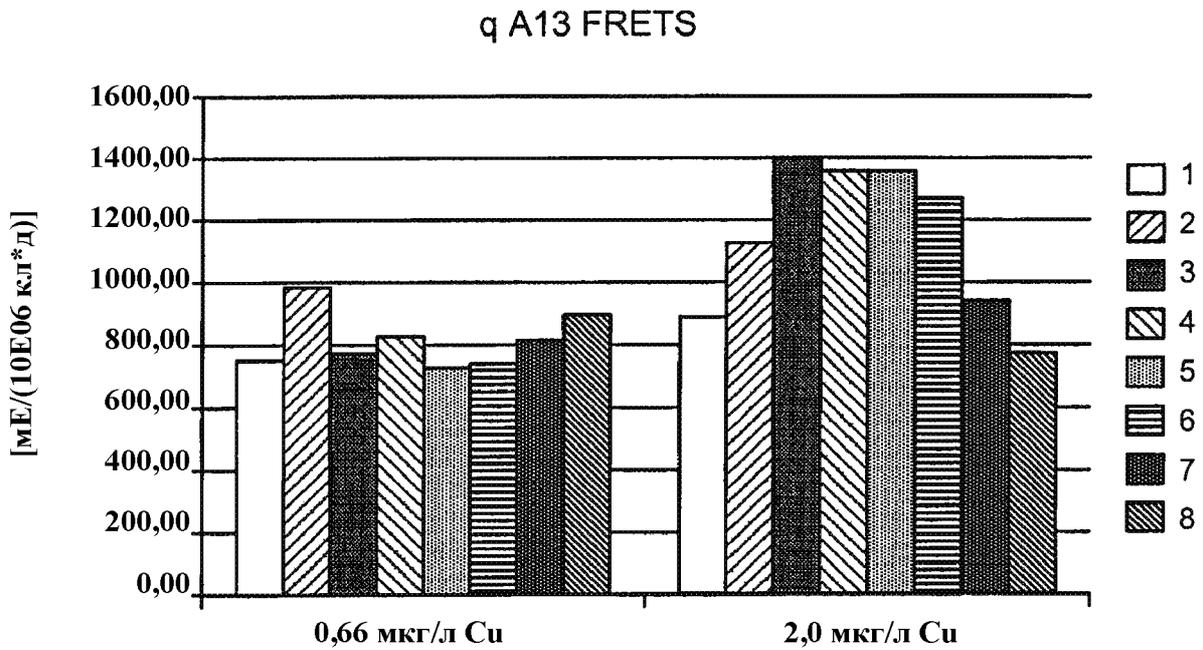
## P A13 FRETS



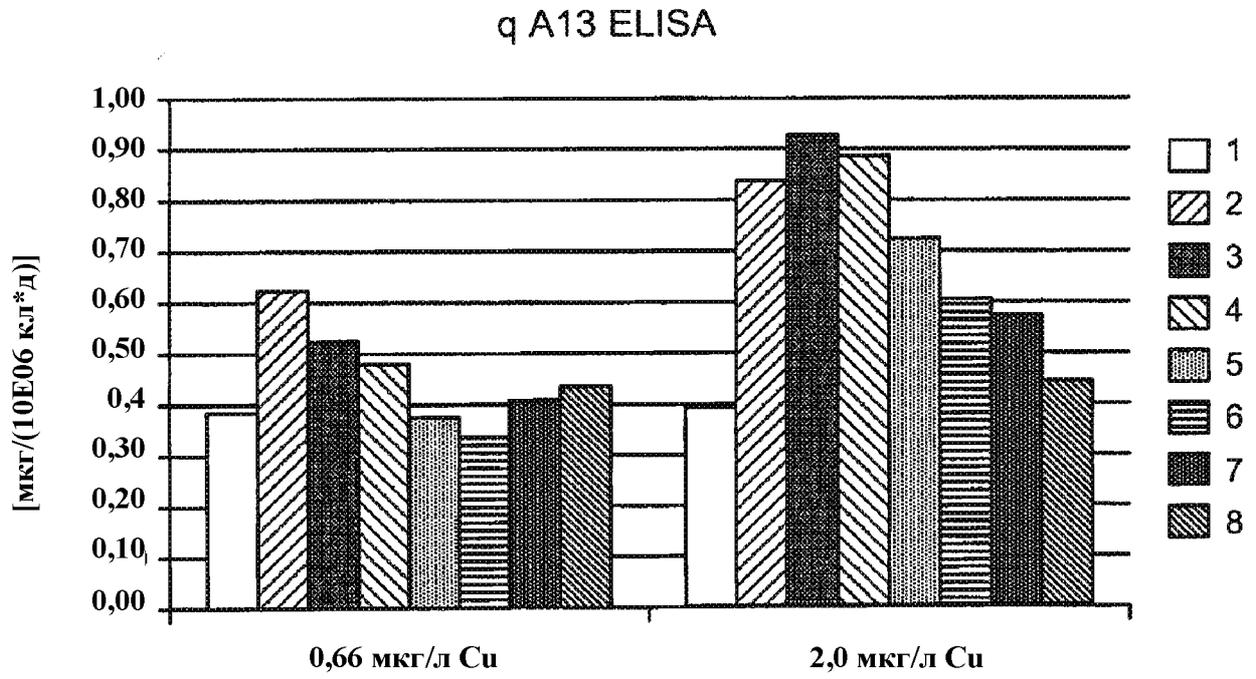
Фиг. 5H



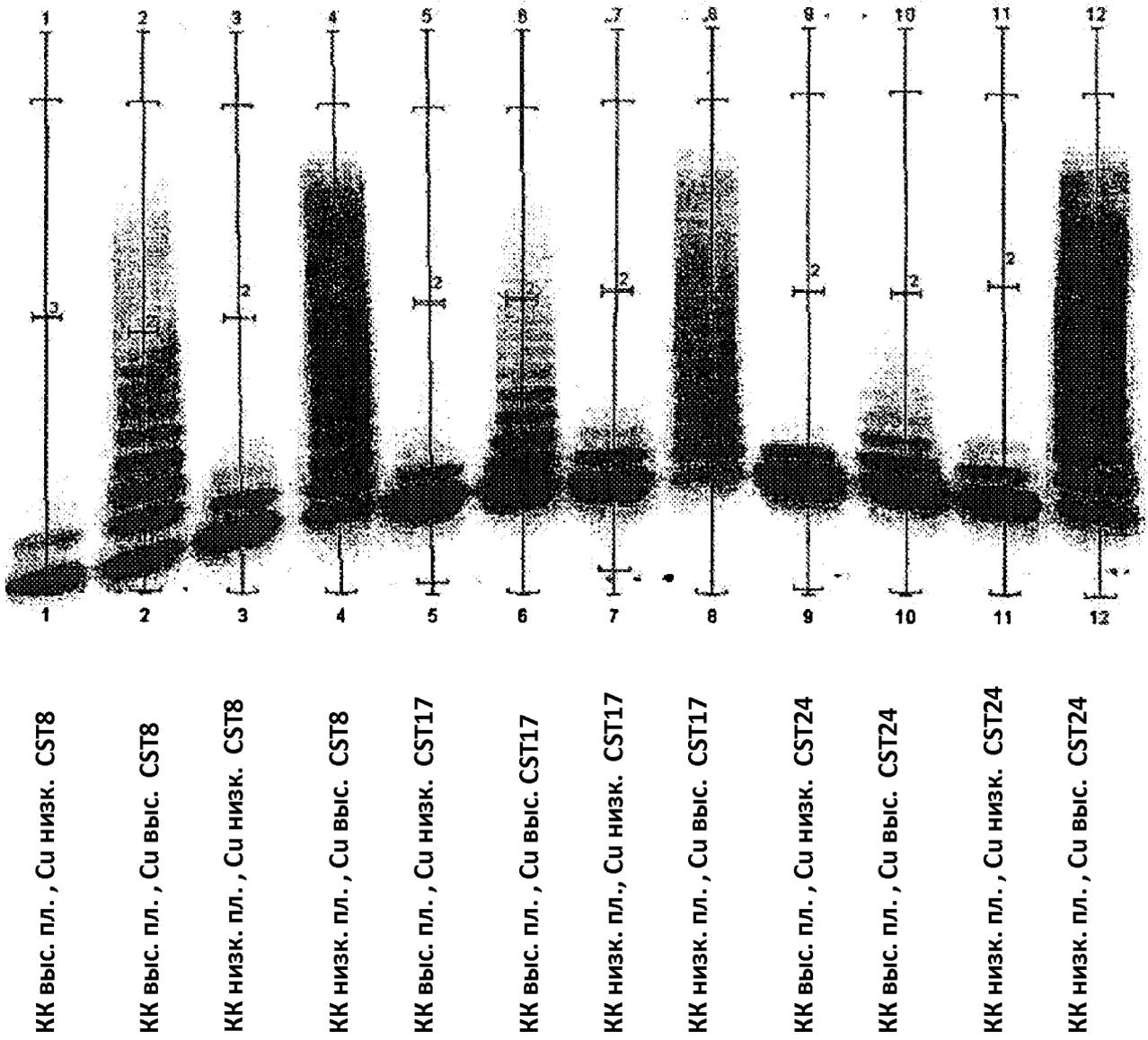
Фиг. 5I



Фиг. 5J



Фиг. 5К



Фиг. 6А

Процент  
gIFN-  
секретирую  
щих CD8+-

Номер полосы	Номер зоны	Примеси 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

Фиг. 6В