

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041947**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.12.16

(21) Номер заявки
202090220

(22) Дата подачи заявки
2011.07.08

(51) Int. Cl. **C07K 14/755** (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОГО VWF В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

(31) 61/362,635

(32) 2010.07.08

(33) US

(43) 2020.05.31

(62) 201390080; 2011.07.08

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)**

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

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

(56) EA-A1-200201008

EP-A1-1148063

PL-T3-1522312

JP-A-2001181200

PLAIMAUER B. et al. Recombinant Willebrand Factor: Preclinical Development. Seminars in Thrombosis and Hemostasis, v.27, No.4, 2001, p.395-403.

FISCHER B.E. et al. Biochemical and functional characterization of recombinant von Willebrand factor produced on large scale. CMLS, Cell. Mol. Life Sci., v.53, 1997, p.943-950.

FISCHER B.E. et al. Structural analysis of recombinant von Willebrand factor produced at industrial scale fermentation of transformed CHO cells co-expressing recombinant furin. FEBS Letters, 1995, v.375, p.259-262.

LOMINADZE D.G. et al. Platelet Aggregation and Adhesion During Dietary Copper Deficiency in Rats. Tromb.Haemost, 1996, v.75, No 4, p.630-634. Реферат

(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 (NH₄⁺). Настоящее изобретение также обеспечивает способы культивирования клеток в условиях клеточной культуры для экспрессии высокомолекулярных vWF и tA13, обладающих высокой удельной активностью.

B1**041947****041947****B1**

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

Область техники

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

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

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

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

В EP-A-0481791 описана культуральная среда с заданным биохимическим составом для культивирования сконструированных клеток CHO, не содержащая белков, липидов и углеводов, выделенных из животных источников, содержащая также рекомбинантный инсулин или аналог инсулина, 1% к 0,025% (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.

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

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

Гемостаз включает взаимодействие различных путей гемостатических реакций, в итоге приводящих к образованию тромба. Тромбы представляют собой отложения компонентов крови на поверхности стенок сосудов, состоящие в основном из агрегированных тромбоцитов крови и нерастворимого перекрестно-сшитого фибрина. Образование фибрина происходит в результате сдерживания протеолиза фибриногена под действием тромбина, фермента свертывания. Тромбин представляет собой конечный продукт каскада свертывания, последовательной активации зимогена на поверхности активированных тромбоцитов и лейкоцитов, и различных клеток сосудов (для ознакомления см. K. G. Mann et al., *Blood*, 1990, Vol. 76, pp. 1-16).

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

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

Фактор фон Виллебранда (vWF) представляет собой гликопротеин, циркулирующий в плазме в виде ряда мультимеров, размер которых варьирует, как правило, от приблизительно 500 до 20000 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 Gp1bα посредством взаимодействия в домене A1 vWF, содействуя адгезии тромбоцитов. Предполагается, что эндотелиальные клетки секретируют крупные полимерные формы vWF, а те формы vWF, которые имеют низкие молекулярные массы (низкомолекулярный vWF), возникают за счет протеолитического расщепления. Мультимеры с большими молекулярными массами накапливаются в тельцах Вейбеля-Палада эндотелиальных клеток и высвобождаются при стимуляции.

Снижение связывающей активности FVIII благодаря сниженным уровням белка vWF или уменьшению связывающей способности FVIII приводит к одному из трех типов болезни Виллебранда. Дополнительно или альтернативно, определенные типы болезни Виллебранда характеризуются повышением или снижением уровня Gp1bα-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 Gp1bα представляет собой целесообразную стратегию для лечения как гемофилии, так и болезни Виллебранда.

Учитывая биологическую важность vWF, существует постоянная необходимость в совершенствовании техники способов получения vWF для терапевтического применения. Общеизвестно, что vWF мо-

жет 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).

К сожалению, vWF представляет собой молекулу, подвергающуюся сложным посттрансляционным модификациям. Кроме того, мультимеризация димеров vWF в большие и ультрабольшие мультимеры в аппарате Гольджи представляет собой сложную задачу при экспрессии в клетках млекопитающих. Так, экспрессия высокомолекулярного vWF в культуре клеток, например, эндотелиальных клетках человека (первичных), зависит от специфического накопления ультрабольших молекул vWF в тельцах Вейбеля-Палада. Такие культуры клеток не подходят для получения терапевтических белков. Описаны и другие способы культивирования клеток; известно, что условия культивирования клеток могут влиять на продуцирование vWF различным образом. Например, показано, что высокие концентрации аммония (NH_4^+) нарушают посттрансляционную модификацию. Mayadas et al. (*J. Biol. Chem.*, 264(23): 13497-13503, 1989) показали, что уровень аммония 25 мМ приводили к снижению мультимеризации vWF в эндотелиальных клетках, что также негативно влияет на удельную ристоцетиновую активность рекомбинантного vWF.

Снижение мультимеризации, как правило, связано со снижением активности, в частности, удельной ристоцетиновой активности, рекомбинантного vWF.

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

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

Один из представителей семейства ADAMTS, ADAMTS13, расщепляет фактор фон Виллебранда (vWF) между остатками Thr 1605 и Met 1606; эта функция отвечает за разложение больших мультимеров vWF in vivo. Установлена связь потери активности ADAMTS 13 с некоторыми состояниями, такими как ТТП (Moake 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).

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

Таким образом, существует необходимость в условиях культивирования клеток, в частности, усло-

виях 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 ADAMTS 13.

Краткое описание изобретения

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

Согласно своему первому аспекту настоящее изобретение обеспечивает способ получения композиции рекомбинантного фактора фон Виллебранда (rVWF); указанный способ включает этапы: (а) обеспечения основных сред для культуры клеток; (b) добавления в основные среды для клеточных культур меди до конечной концентрации меди по меньшей мере 2,4 мкг/л; (с) обеспечения одной или более клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую белок rVWF ; (d) культивирования указанной одной или более клеток в среде для клеточных культур с добавлением меди таким образом, что происходит экспрессия и экскреция rVWF из клеток в культуральный супернатант; и (е) отделения по меньшей мере части указанного культурального супернатанта, причем указанный отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью rVWF, составляющей по меньшей мере 30 МЕ/мкг rVWF.

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.

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

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

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

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

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.

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

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.

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.

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.

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

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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

Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов содержание NH_4^+ в указанном культуральном супернатанте поддерживают на уровне концентрации ниже 10 мМ.

Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов содержание NH_4^+ в указанном культуральном супернатанте поддерживают на уровне концентрации ниже 4 мМ.

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.

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

Согласно второму аспекту настоящее изобретение обеспечивает композицию рекомбинантного фактора фон Виллебранда (rVWF), полученную описанным в настоящем изобретении способом.

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.

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.

Согласно третьему аспекту настоящее изобретение обеспечивает супернатант культуры клеток, содержащий рекомбинантный фактор фон Виллебранда (rVWF), отличающийся тем, что указанный супернатант получают описанным в настоящем изобретении способом.

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

те 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 настоящем изобретении способу.

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 настоящем изобретении способу.

Согласно шестому аспекту настоящее изобретение обеспечивает способ получения композиции рекомбинантного ADAMTS13 (A13); указанный способ включает этапы: (а) обеспечения основных сред для культуры клеток; (b) добавления в основные среды для клеточных культур меди до конечной концентрации меди по меньшей мере 1,0 мкг/л; (с) обеспечения одной или более клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую белок гA13; (d) культивирования указанной одной или более клеток в среде для клеточных культур с добавлением меди таким образом, что происходит экспрессия и экскреция гA13 из клеток в культуральный супернатант; и (е) отделения по меньшей мере части указанного культурального супернатанта, причем в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 1500 единиц активности FRETS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день.

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

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

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

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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

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 хемостатическом режиме. Согласно другому конкретному варианту реализации указанное непрерывное культивирование клеток производится в режиме перфузии.

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.

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.

Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов плотность клеток под-

держивают на уровне менее чем $3,5 \times 10^6$ клеток/мл на протяжении этапа культивирования указанной одной или более клеток.

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.

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.

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.

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.

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.

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

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

Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов отделенный супернатант обладает удельной FRETs-VWF73 активностью гA13, составляющей по меньшей мере 800 мЕ/мкг.

Согласно предпочтительному варианту реализации описанных выше способов отделенный супернатант обладает удельной FRETs-VWF73 активностью гA13, составляющей по меньшей мере 1200 мЕ/мкг.

Согласно более предпочтительному варианту реализации описанных выше способов отделенный супернатант обладает удельной FRETs-VWF73 активностью гA13, составляющей по меньшей мере 1600 мЕ/мкг.

Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов содержание NH_4^+ в указанном культуральном супернатанте поддерживают на уровне ниже 10 мМ.

Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов содержание NH_4^+ в указанном культуральном супернатанте поддерживают на уровне ниже 5 мМ.

Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов содержание NH_4^+ в указанном культуральном супернатанте поддерживают на уровне концентрации ниже 4 мМ.

Согласно одному из вариантов реализации предложенных выше способов указанный способ дополнительно включает этап обогащения гA13.

Согласно седьмому аспекту настоящее изобретение обеспечивает супернатант культуры клеток, содержащий рекомбинантный ADAMTS13 (гA13), отличающийся тем, что указанный супернатант получают описанным в настоящем изобретении способом.

Согласно восьмому аспекту настоящее изобретение обеспечивает супернатант культуры клеток, содержащий рекомбинантный фактор фон Виллебранда (гVWF), отличающийся тем, что указанный супернатант содержит по меньшей мере 5 единиц активности FRETs-VWF73 на мл. Согласно конкретному варианту реализации указанный супернатант содержит по меньшей мере 6 единиц активности FRETs-VWF73 на мл. Согласно другому конкретному варианту реализации указанный супернатант содержит по меньшей мере 7 единиц активности FRETs-VWF73 на мл. Согласно другому конкретному варианту реализации указанный супернатант содержит по меньшей мере 8 единиц активности FRETs-VWF73 на мл. Согласно другому конкретному варианту реализации указанный супернатант содержит по меньшей мере 9 единиц активности FRETs-VWF73 на мл. Согласно другому конкретному варианту реализации указанный супернатант содержит по меньшей мере 10 единиц активности FRETs-VWF73 на мл. Согласно еще одному конкретному варианту реализации вышеописанных супернатантов супернатант получают согласно описанному в настоящем изобретении способу.

Согласно девятому аспекту настоящее изобретение обеспечивает супернатант культуры клеток, содержащий рекомбинантный фактор фон Виллебранда (гVWF), при этом указанный супернатант содержит по меньшей мере 2 мкг гA13 на мл. Согласно конкретному варианту реализации супернатант содержит по меньшей мере 3 мкг гA13 на мл. Согласно другому конкретному варианту реализации супернатант содержит по меньшей мере 4 мкг гA13 на мл. Согласно другому конкретному варианту реализации супернатант содержит по меньшей мере 5 мкг гA13 на мл. Согласно другому конкретному варианту реализации супернатант содержит по меньшей мере 6 мкг гA13 на мл. Согласно еще одному конкретному варианту реализации вышеописанных супернатантов супернатант получают согласно описанному в на-

стоящем изобретении способу.

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

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

Фиг. 1. (1A) Электрофорез в агарозном геле низкого разрешения (1 %) rVWF, экспрессируемого в культурах клеток млекопитающих в присутствии низкой (1,0 мкг/л) и высокой (4,3 мкг/л) концентраций меди, согласно описанию в примере 2. Отметим, что день культивирования 3 эквивалентен дню периодической культуры 1 из табл.7 и 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. 1 A, количественно определяли денситометрическим анализом.

Фиг. 2. (2A) Интервальный график средней удельной активности rVWF в супернатантах клеточных культур rVWF, выращенных при высокой и низкой плотности клеток в присутствии высоких или низких уровней меди. (2B) Интервальный график средней концентрации NH_4^+ , обнаруживаемой в супернатантах клеточных культур rVWF, выращенных при высокой и низкой плотности клеток в присутствии высоких или низких уровней меди.

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

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

Фиг. 5A-K. Ступенчатые диаграммы при непрерывном суспензионном (хеMOSTАТИЧЕСКОМ) 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 хеMOSTАТИЧЕСКОЙ культуры. Легенда относится к конкретным неделям, для которых представлены данные.

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

Подробное описание изобретения

I. Введение.

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 20000-литровых культур).

Одним из потенциальных источников вариативности, часто наблюдаемой в разных партиях клеточной культур, является присутствие загрязнителей в компонентах сред для клеточных культур. Указанные загрязнители могут присутствовать в различном количестве в разных партиях, что приводит к варьирующим результатам при получении 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.

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 активность, 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 настоящем изобретении. Удачным образом, согласно определенным вариантам реализации описанных в настоящем изобретении 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 настоящем изобретении. 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 настоящем изобретении.

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

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены способы культивирования клеток, согласно которым в основную среду для клеточной культуры добавляют от приблизительно 1,0 до приблизительно 20 мкг/л меди для продуцирования 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.

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.

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

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

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

гласно настоящему изобретению приводит к повышению выхода белка, увеличению числа клеток в культуре и/или повышению общей активности на литр культуры по сравнению со средами без добавления меди.

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

Хотя значительная часть обсуждения белков ADAMTS в настоящем изобретении относится к ADAMTS 13 (A13), необходимо понимать, что, так как все белки ADAMTS имеют общую структуру центрального домена и общие структурно-функциональные связи, способы и композиции, описанные в настоящем изобретении, применимы для получения любых белков ADAMTS, не ограничиваясь гA13.

Определения

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

Термин "рекомбинантный" при использовании, например, в отношении клетки или нуклеиновой кислоты, белка или вектора, означает, что указанная клетка, нуклеиновая кислота, белок или вектор модифицированы введением гетерологичной(ного) нуклеиновой кислоты или белка, либо изменением нативной (нативного) 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 (нерекомбинантных) формах указанных клеток или экспрессируют нативные гены, которые в противном случае экспрессируются аномально, экспрессируются недостаточно или не экспрессируются вообще.

В контексте настоящего изобретения "рекомбинантный vWF" охватывает любые члены семейства vWF, например, от млекопитающих, таких как приматы, человек, обезьяна, кролик, свинья, грызуны, мышь, крыса, хомяк, песчанка, собачьи, кошачьи; и их биологически активные производные. Согласно предпочтительному варианту реализации рекомбинантный VWF представляет собой VWF человека. 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 настоящем изобретении, могут также быть модифицированы терапевтическим агентом или агентом, подходящим для визуализации *in vitro* или *in vivo*.

Термины "высокомультимерный vWF", "высокомолекулярный vWF" и "HMW VWF" могут 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.

Используемый в настоящем изобретении термин "белок ADAMTS" относится к полипептиду - де-зинтегрину и металлопротеиназе из семейства металлопротеиназ с мотивами тромбоспондина I типа. Члены указанного семейства включают белки человека ADAMTS1 (NM_006988), ADAMTS2 (NM_014244; NM_021599), ADAMTS3 (NM_014243), ADAMTS4 (NM_005099), ADAMTS5 (NM_007038), ADAMTS6 (NM_014273), ADAMTS7 (NM_0142727), ADAMTS8 (NM_007037), ADAMTS9 (NM_182920; NM_182921; NM_020249), ADAMTS10 (NM_030957), ADAMTS12 (NM_030955), ADAMTS13 (NM_139025; NM_139026; NM_139027; NM_139028), ADAMTS14 (NM_139155; NM_080722), ADAMTS15 (NM_139055), ADAMTS16 (NM_139056), ADAMTS17 (NM_139057), ADAMTS18 (NM_199355; NM_139054), ADAMTS19 (NM_133638) и ADAMTS20 (NM_025003, NM_175851). Белки ADAMTS включают и полноразмерные белки, и неполные полипептиды, которые проявляют по меньшей мере частичную биологическую активность, например, по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более, от активности, демонстрируемой полноразмерным белком, в частности, протеазной активности, демонстрируемой полноразмерным белком. В определенных случаях белок ADAMTS подвергается посттрансляционной модификации *in vivo* или *in vitro*, например, ферментативным или химическим путем. Понятно, что белки ADAMTS согласно настоящему изобретению включают изоформы альтернативного сплайсинга, консервативно модифицированные белки, идентичные по существу белки, гомологи и т.п.

В контексте настоящего изобретения термин "белок ADAMTS" охватывает любые члены семейства

ADAMTS, происходящие, например, из млекопитающих, таких как приматы, человек, обезьяна, кролик, свинья, грызуны, мышь, крыса, хомяк, песчанка, собачьи, кошачьи, и их биологически активные производные. Мутантные и варианты белки ADAMTS, обладающие активностью, также включены, как и функциональные фрагменты и гибриды белков ADAMTS. Кроме того, белки ADAMTS согласно настоящему изобретению могут также содержать метки, облегчающие очистку или определение, или и то, и другое. Белки ADAMTS, описанные в настоящем изобретении, могут также быть модифицированы терапевтическим агентом или агентом, подходящим для визуализации *in vitro* или *in vivo*.

Используемый в настоящем изобретении термин "белок ADAMTS 13" относится к любому белку или полипептиду, обладающему активностью ADAMTS 13, в частности, способностью расщеплять пептидную связь между остатками Thr-842 и Met-843 в VWF. Согласно типовому варианту реализации "белок ADAMTS 13" 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 настоящем изобретении термин "белок ADAMTS13" включает природные варианты, обладающие vWF-расщепляющей активностью, и искусственные конструкции, обладающие vWF-расщепляющей активностью. Согласно применению в настоящем описании "ADAMTS13" охватывает любые природные варианты, альтернативные последовательности, изоформы или мутантные белки, сохраняющие некоторую степень основной активности. Примеры мутаций ADAMTS13, обнаруживаемые в популяциях человека, включают без ограничений R7W, V88M, H96D, R102C, R193W, T196I, H234Q, A250V, R268P, W390C, R398H, Q448E, Q456H, P457L, C508Y, R528G, P618A, R625H, I673F, R692C, A732V, S903L, C908Y, C951G, G982R, C1024G, A1033T, R1095W, R1123C, C1213Y, T1226I, G1239V, R1336W, для многих из которых показана связь с тромботической тромбоцитопенической пурпурой (ТТП). Белки ADAMTS13 также включают полипептиды, содержащие посттрансляционные модификации. Например, показано, что ADAMTS13 модифицируется N-ацетилглюкозамином (GlcNAc) по остаткам 614, 667 и 1354, и предсказано, что остатки 142, 146, 552, 579, 707, 828 и 1235 могут также модифицироваться таким образом.

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

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

Термины "выделенный", "очищенный" или "биологически чистый" относятся к веществу, практически или по существу не содержащему компонентов, обычно сопутствующих ему в естественном состоянии. Чистоту и гомогенность, как правило, определяют с применением техник аналитической химии, таких как электрофорез в полиакриламидном геле или жидкостная хроматография высокого разрешения. Согласно одному из вариантов реализации rVWF представляет собой преобладающий компонент в существенно очищенном составе. Согласно другому варианту реализации rA13 представляет собой преобладающий компонент в существенно очищенном составе. Термин "очищенный" согласно некоторым ва-

риантам 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%.

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 настоящем изобретении удельную ристоцетин-кофакторную активность vWF согласно настоящему изобретению выражают в мЕ/мкг vWF согласно оценке с применением методов анализа *in vitro*.

Используемый в настоящем изобретении 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 ADAMTS 13, одна единица активности ADAMTS 13 FRETS-VWF73 представляет собой уровень активности, необходимый для расщепления такого же количества субстрата FRETS-VWF73 (Kokame et al., Br J Haematol. 2005 Apr; 129(1):93-100), которое расщепляется одним мл смешанной нормальной плазмы человека. Удобно, что активность ADAMTS 13 может быть определена методами функционального анализа, такими как функциональный анализ с применением модифицированных пептидов фактора фон Виллебранда в качестве субстрата ADAMTS 13 (Tripodi et al. J Thromb Haemost. 2008 Sep;6(9): 1534-41). Предпочтительный способ определения активности рекомбинантного ADAMTS13 человека описан у Gerritsen et al. (Assay of von Willebrand factor (vWF)-cleaving protease based on decreased collagen binding affinity of degraded vWF: a tool for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) ("Анализ протеазы, расщепляющей фактор фон Виллебранда (vWF), основанный на понижении коллаген-связывающей способности деградированного vWF: инструмент для диагностики тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП)"). Thromb Haemost 1999; 82: 1386-1389). Согласно одному из вариантов реализации, чтобы считаться белком ADAMTS13 согласно приведенному выше определению, полипептид или белок должен обладать по меньшей мере 1% vWF-расщепляющей активности нативного ADAMTS13. Согласно другим вариантам реализации белок ADAMTS13 обладает по меньшей мере 10% активности нативного ADAMTS13. Согласно другим вариантам реализации белок ADAMTS13 обладает по меньшей мере 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% активности нативного ADAMTS13. Количество белка ADAMTS13 также может быть определено измерением антигена ADAMTS13, например, с применением метода ИФА (ELISA), описанного у Rieger et al, (2006, Thromb Haemost. 2006 95(2):212- 20). В данной области техники общепризнано, что 1 мл смешанной нормальной плазмы человека содержит 1 мкг ADAMTS13. Таким образом, согласно общепринятому в данной области техники правилу 1 мкг полученного из плазмы ADAMTS13 обладает одной единицей активности ADAMTS13.

Термины "раствор культуры клеток", "среда или среды для клеточной культуры" и "супернатант культуры клеток" относятся к аспектам процессов культивирования клеток, как правило, общеизвестным в данной области техники. В контексте настоящего изобретения раствор культуры клеток может включать среды для клеточных культур и супернатант культуры клеток. Указанные среды для клеточных культур вводят в раствор культуры клеток извне, необязательно вместе с добавками, для обеспечения питательных веществ и других компонентов для культивирования клеток, экспрессирующих гVWF или гA13. Термин "супернатант культуры клеток" относится к раствору культуры клеток, содержащему питательные вещества и другие компоненты из среды для клеточной культуры, а также продукты, высвобождаемые, метаболизируемые и/или экскретируемые клетками во время культивирования, но не сами клетки. Таким образом, согласно одному контексту "супернатант культуры клеток" может относиться к жидкой фазе раствора культуры клеток (т.е. к раствору культуры клеток, исключая клетки). Например, концентрация аммония культурального супернатанта, как правило, относится к концентрации аммония в растворе культуры клеток. Согласно другим контекстам "супернатант культуры клеток" относится к раствору культуры клеток, из которого указанные клетки были извлечены (т.е. отделенному супернатанту культуры клеток).

Используемые в настоящем изобретении 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.

Используемый в настоящем изобретении 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 настоящее изобретение посредством ссылки во всей полноте для любых целей.

Используемый в настоящем изобретении 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 настоящее изобретение посредством ссылки во всей полноте для любых целей.

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

Используемый в настоящем изобретении 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 настоящее изобретение посредством ссылки во всей полноте для любых целей.

Используемый в настоящем изобретении термины "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 неионные ПАВ, такие как сополимеры и/или смеси полиэтиленгликолей и полипропиленгликолей.

II. Среда для клеточных культур и супернатант культуры клеток.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к средам для клеточных культур для получения rVWF и/или 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 гVWF и/или гA13, управляют таким образом, чтобы поддерживать в супернатанте культуры клеток низкий уровень аммония, т.е. менее чем 10 мМ и, предпочтительно, менее чем 5 мМ.

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

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

Медь может быть введена в среды для клеточных культур согласно настоящему изобретению с помощью различных способов, например, введением добавки в среду. Согласно некоторым вариантам реализации указанная добавка в культуральную среду может содержать гидролизат, который можно применять для повышения концентрации меди в указанной среде. Гидролизаты могут включать любой гидролизат из общеизвестных в данной области техники, таких как растительные гидролизаты, соевые гидролизаты и гидролизат пшеничной клейковины. Согласно определенным вариантам реализации добавление гидролизата может способствовать повышенной концентрации меди, от приблизительно 0,2 до приблизительно 10 мкг/л Cu^{2+} . Согласно некоторым вариантам реализации количество меди, обеспеченное гидролизатом, может зависеть от количества меди в указанном гидролизате, а также количества добавленного гидролизата. Содержание меди в гидролизате может быть определено элементным анализом, например, адсорбционной атомной спектроскопией (GFAA: атомной абсорбцией в графитовой печи), или масс-спектрометрическими методами (например, ИСП-МС).

Согласно определенным вариантам реализации медь может вводиться в культуральные среды, сама по себе или вместе с гидролизатом, путем введения средовой добавки, включая подходящую соль меди или хелат меди. Подходящая 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, аминоэтилэтаноламин, 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-диазаациклододекан, 1,4,8,11-тетраазаациклотетрадекан-5,7-дион, 1,4,7-триазаациклононана тригидрохлорид, 1-окса-4,7,10-триазаациклододекан, 1,4,8,12-тетраазаациклопентадекан и 1,4,7,10-тетраазаациклододекан.

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 кон-

центрации 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 настоящем изобретении культуры для получения гA13 могут содержать приблизительно 2-4 мкг/л меди, тогда как культуры для получения гVWF могут содержать по меньшей мере 2 мкг/л меди.

Вышеуказанные концентрации представляют собой относительные концентрации чистой меди в форме двухвалентного иона меди (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 настоящем изобретении диапазоны. Например, 2 мкг/л $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ эквивалентны концентрации меди, составляющей приблизительно 0,51 мкг/л (без сульфата и $5\text{H}_2\text{O}$).

Удачным образом, было обнаружено, что применение в процессе культивирования клеток среды для клеточной культуры, обеспечивающей низкие концентрации (NH_4^+) в растворе культуры клеток (т.е. в культуральном супернатанте), приводит к экспрессии рекомбинантного VWF и/или гA13 с более высокой удельной активностью. Соответственно, согласно определенным вариантам реализации концентрация NH_4^+ в указанном супернатанте составляет не более чем 10 мМ. Согласно предпочтительному варианту реализации концентрация NH_4^+ в указанном супернатанте составляет не более чем 5 мМ. Согласно предпочтительному варианту реализации концентрация NH_4^+ в указанном супернатанте составляет не более чем 4 мМ. Согласно другим вариантам реализации концентрация 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.

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 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

		Концентрация аммония										
		Н.О.	НБЧ 10мМ	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

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 настоящее изобретение посредством ссылки во всей полноте для любых целей. Согласно одному из вариантов реализации основная культуральная среда, применяемая в способах, описанных в настоящем изобретении, представляет собой не содержащую животных белков или не содержащую олигопептидов среду. Согласно определенным вариантам реализации указанная культуральная среда может быть средой с заданным химическим составом. Согласно определенным вариантам реализации указанные культуральные среды могут содержать по меньшей мере один полиамин в концентрации от приблизительно 0,5 мг/л до приблизительно 10 мг/л.

Согласно дальнейшим вариантам реализации и в дополнение к любым описанным выше согласно настоящему изобретению предложены культуральные среды, для получения которых в основную среду добавляют медь и по меньшей мере что-либо одно из кальция, цинка и/или витамина B3. 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 настоящее изобретение посредством ссылки во всей полноте для любых целей; оба источника включены в настоящее изобретение посредством ссылки во всей полноте для любых целей; и добавлением дополнительной меди и необязательно одного или более из кальция, цинка и витамина B3. 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 B3 для увеличения удельной активности gVWF или gA13, экспрессируемых в клетках, культивируемых в указанной среде. Согласно другим вариантам реализации указанная культуральная среда не содержит животных компонентов. Согласно другому варианту реализации указанная культуральная среда содержит белок, например, животный белок из сыворотки, такой как эмбриональная телячья сыворотка. Согласно другому варианту реализации указанная культура содержит добавленные экзогенные рекомбинантные белки. Согласно другому варианту реализации указанные белки получены от сертифицированного свободного от патогенов животного.

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

Согласно одному из вариантов реализации указанная культуральная среда содержит по меньшей мере один полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л, и комбинацию меди и аммония согласно любому из вариантов 1-440, приведенных в табл. 1. Согласно другому варианту реализации указанная культуральная среда содержит по меньшей мере один полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 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 до 8 мг/л путресцина и комбинацию меди и аммония согласно любому из вариантов 1-440, приведенных в табл. 1.

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

Как правило, для добавления в среды согласно настоящему изобретению может применяться любая соль кальция; неограничивающие примеры приемлемых солей включают CaCl_2 , $\text{CaFPO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CaI_2 ,

CaBr_2 , $(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2\text{Ca}$, $(\text{CHO}_2)_2\text{Ca}$, $(\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6)_2\text{Ca}$, $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и т.п. Согласно определенным вариантам реализации для добавления в культуральные среды согласно настоящему изобретению применяют фармацевтически приемлемую соль кальция.

Как правило, для добавления в среды согласно настоящему изобретению может применяться любая соль цинка; неограничивающие примеры приемлемых солей включают $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2\text{Zn}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ZnBr_2 , $\text{ZnBr}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 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 настоящем изобретении культуру.

Согласно дальнейшим аспектам основные клеточные среды с добавлением меди и одного или более из описанных выше дополнительных веществ можно также применять в культурах с низкими уровнями аммония в супернатанте. Согласно определенным вариантам реализации дополненные среды для клеточных культур для применения согласно настоящему изобретению дают уровни аммония в растворе культуры клеток менее 10 мМ. Согласно дальнейшим вариантам реализации дополненную среду для клеточных культур согласно настоящему изобретению применяют при уровнях аммония в культуре клеток, составляющих приблизительно 0,5-9,5; 1,0-9,0; 1,5-8,5; 2,0-8,0; 2,5-7,5; 3,0-7,0; 3,5-6,5; 4,0-6,0; 4,5-5,5 мМ.

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

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

Ниже обсуждаются характерные особенности сред для клеточных культур, подходящих для получения rVWF или rA13. Несмотря на то, что они описаны применительно либо к rVWF, либо к RA13, необходимо понимать, что любые приведенные ниже описания, относящиеся к rVWF, подходят и для RA13, и наоборот.

А. Среда для клеточных культур для получения рекомбинантного VWF.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к раствору культуры клеток для получения рекомбинантных vWF, более конкретно - высокомолекулярных vWF, обладающих высокой удельной активностью, которые описаны ниже в настоящем изобретении. 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.

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).

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

Согласно другим вариантам реализации концентрация меди в среде для клеточных культур согласно настоящему изобретению может варьировать от приблизительно 2,4 мкг/л до приблизительно 20 мкг 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.

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

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

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

Согласно одному из аспектов настоящее изобретение предлагает среды для клеточных культур с добавлением меди для экспрессии рекомбинантного белка ADAMTS 13 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.

Согласно одному из вариантов реализации раствор культуры клеток также содержит аммоний в концентрации менее чем 10 mM. Согласно предпочтительному варианту реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации не выше 5 mM. Согласно другим вариантам реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации не выше 10 mM, или не выше 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM 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 mM в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно другому конкретному варианту реализации концентрацию аммония в культуре клеток поддерживают на уровне не выше 4 mM 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 гА13).

Согласно одному из вариантов реализации получают культуральную среду для экспрессии рекомбинантного белка ADAMTS (например, гADAMTS13), содержащую по меньшей мере 1 мкг/л меди и по меньшей мере 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

		Концентрация цинка										
		ПММ 2 мкМ	ПММ 3 мкМ	ПММ 4 мкМ	ПММ 5 мкМ	ПММ 6 мкМ	ПММ 7 мкМ	ПММ 8 мкМ	ПММ 9 мкМ	ПММ 10 мкМ	2–12 мкМ	5–12 мкМ
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	Вар.	Вар.	Вар.	Вар.	Вар.	Вар.	Вар.	Вар.	Вар.	Вар.	Вар.

2 мкг/л	453	493	533	573	613	653	693	733	773	813	853
Приблизительно 2,5 мкг/л	Var. 454	Var. 494	Var. 534	Var. 574	Var. 614	Var. 654	Var. 694	Var. 734	Var. 774	Var. 814	Var. 854
Приблизительно 3 мкг/л	Var. 455	Var. 495	Var. 535	Var. 575	Var. 615	Var. 655	Var. 695	Var. 735	Var. 775	Var. 815	Var. 855
Приблизительно 3,5 мкг/л	Var. 456	Var. 496	Var. 536	Var. 576	Var. 616	Var. 656	Var. 696	Var. 736	Var. 776	Var. 816	Var. 856
Приблизительно 4 мкг/л	Var. 457	Var. 497	Var. 537	Var. 577	Var. 617	Var. 657	Var. 697	Var. 737	Var. 777	Var. 817	Var. 857
Приблизительно 4,5 мкг/л	Var. 458	Var. 498	Var. 538	Var. 578	Var. 618	Var. 658	Var. 698	Var. 738	Var. 778	Var. 818	Var. 858
Приблизительно 5 мкг/л	Var. 459	Var. 499	Var. 539	Var. 579	Var. 619	Var. 659	Var. 699	Var. 739	Var. 779	Var. 819	Var. 859
Приблизительно 5,5 мкг/л	Var. 460	Var. 500	Var. 540	Var. 580	Var. 620	Var. 660	Var. 700	Var. 740	Var. 780	Var. 820	Var. 860
Приблизительно 6 мкг/л	Var. 461	Var. 501	Var. 541	Var. 581	Var. 621	Var. 661	Var. 701	Var. 741	Var. 781	Var. 821	Var. 861
Приблизительно 7 мкг/л	Var. 462	Var. 502	Var. 542	Var. 582	Var. 622	Var. 662	Var. 702	Var. 742	Var. 782	Var. 822	Var. 862
Приблизительно 8 мкг/л	Var. 463	Var. 503	Var. 543	Var. 583	Var. 623	Var. 663	Var. 703	Var. 743	Var. 783	Var. 823	Var. 863
Приблизительно 9 мкг/л	Var. 464	Var. 504	Var. 544	Var. 584	Var. 624	Var. 664	Var. 704	Var. 744	Var. 784	Var. 824	Var. 864
Приблизительно 10 мкг/л	Var. 465	Var. 505	Var. 545	Var. 585	Var. 625	Var. 665	Var. 705	Var. 745	Var. 785	Var. 825	Var. 865
1–20 мкг/л	Var. 466	Var. 506	Var. 546	Var. 586	Var. 626	Var. 666	Var. 706	Var. 746	Var. 786	Var. 826	Var. 866
2–20 мкг/л	Var. 467	Var. 507	Var. 547	Var. 587	Var. 627	Var. 667	Var. 707	Var. 747	Var. 787	Var. 827	Var. 867
1–10 мкг/л	Var. 468	Var. 508	Var. 548	Var. 588	Var. 628	Var. 668	Var. 708	Var. 748	Var. 788	Var. 828	Var. 868
2–10 мкг/л	Var. 469	Var. 509	Var. 549	Var. 589	Var. 629	Var. 669	Var. 709	Var. 749	Var. 789	Var. 829	Var. 869
1–6 мкг/л	Var. 470	Var. 510	Var. 550	Var. 590	Var. 630	Var. 670	Var. 710	Var. 750	Var. 790	Var. 830	Var. 870
2–6 мкг/л	Var. 471	Var. 511	Var. 551	Var. 591	Var. 631	Var. 671	Var. 711	Var. 751	Var. 791	Var. 831	Var. 871
3–6 мкг/л	Var. 472	Var. 512	Var. 552	Var. 592	Var. 632	Var. 672	Var. 712	Var. 752	Var. 792	Var. 832	Var. 872
4–6 мкг/л	Var. 473	Var. 513	Var. 553	Var. 593	Var. 633	Var. 673	Var. 713	Var. 753	Var. 793	Var. 833	Var. 873
1–5 мкг/л	Var. 474	Var. 514	Var. 554	Var. 594	Var. 634	Var. 674	Var. 714	Var. 754	Var. 794	Var. 834	Var. 874
2–5 мкг/л	Var. 475	Var. 515	Var. 555	Var. 595	Var. 635	Var. 675	Var. 715	Var. 755	Var. 795	Var. 835	Var. 875
3–5 мкг/л	Var. 476	Var. 516	Var. 556	Var. 596	Var. 636	Var. 676	Var. 716	Var. 756	Var. 796	Var. 836	Var. 876
4–5 мкг/л	Var. 477	Var. 517	Var. 557	Var. 597	Var. 637	Var. 677	Var. 717	Var. 757	Var. 797	Var. 837	Var. 877
1–4 мкг/л	Var. 478	Var. 518	Var. 558	Var. 598	Var. 638	Var. 678	Var. 718	Var. 758	Var. 798	Var. 838	Var. 878
2–4 мкг/л	Var. 479	Var. 519	Var. 559	Var. 599	Var. 639	Var. 679	Var. 719	Var. 759	Var. 799	Var. 839	Var. 879
3–4 мкг/л	Var. 480	Var. 520	Var. 560	Var. 600	Var. 640	Var. 680	Var. 720	Var. 760	Var. 800	Var. 840	Var. 880

*ПММ = по меньшей мере

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

концентрацию аммония поддерживают на уровне не выше 5 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно другому предпочтительному варианту реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации не выше 4 мМ, и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных в табл.2. Согласно конкретному варианту реализации концентрацию аммония поддерживают на уровне не выше 4 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно другим вариантам реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации не выше 10 мМ, или не выше 9 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 гА13).

Согласно одному из вариантов реализации получают культуральную среду для экспрессии рекомбинантного белка ADAMTS (например, гADAMTS13), содержащую по меньшей мере 1 мкг/л меди и по меньшей мере точно или приблизительно 0,5 мМ кальция. Согласно другим вариантам реализации указанная среда содержит по меньшей мере 2 мкг/л меди или по меньшей мере 4 мкг/л меди. Согласно другому варианту реализации, когда в среды добавляют медь, указанная культуральная среда также содержит по меньшей мере 1,5 мМ кальция. Согласно одному из вариантов реализации указанная культуральная среда содержит точно или приблизительно от 0,5 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

		Концентрация кальция										
		ПММ 0,5 мМ	ПММ 0,75 мМ	ПММ 1,0 мМ	ПММ 1,25 мМ	ПММ 1,5 мМ	ПММ 2,0 мМ	ПММ 2,5 мМ	ПММ 3,0 мМ	ПММ 4 мМ	ПММ 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. 1281
	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. 1282
	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. 1283
	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. 1284
	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. 1285
	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. 1286
	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. 1287
	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. 1288
	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. 1289
	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. 1290
	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. 1291
	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. 1292
	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. 1293

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

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 вариан-

ту 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 гА13).

Согласно одному из вариантов реализации в среду для клеточной культуры добавляют медь, цинк и кальций. Согласно конкретному варианту реализации культуральная среда содержит кальций в концентрации по меньшей мере 0,5 мМ, и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных в табл.2. Согласно другому конкретному варианту реализации культуральная среда содержит кальций в концентрации по меньшей мере 1,5 мМ, и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных в табл. 2. Согласно другому конкретному варианту реализации указанная культуральная среда содержит кальций в концентрации от 0,5 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 одному из вариантов реализации получают культуральную среду для экспрессии рекомбинантного белка ADAMTS (например, гADAMTS13), содержащую по меньшей мере 1 мкг/л меди и по меньшей мере 2 мг/л никотинамида (витамин В3). Согласно другим вариантам реализации указанная среда содержит по меньшей мере 2 мкг/л меди или по меньшей мере 4 мкг/л меди. Согласно другому варианту реализации, когда в среды добавляют медь, указанная культуральная среда также содержит по меньшей мере 7 мг/л никотинамида (витамина В3). Согласно одному из вариантов реализации указанная культуральная среда содержит точно или приблизительно от 2 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

		Концентрация кальция										
		ПММ 2 мг/мл	ПММ 3 мг/мл	ПММ 4 мг/мл	ПММ 5 мг/мл	ПММ 6 мг/мл	ПММ 7 мг/мл	ПММ 8 мг/мл	ПММ 9 мг/мл	ПММ 10 мг/мл	ПММ 15 мг/мл	2–10 мг/мл
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
	ПММ 8 мкг/л	Вар. 1328	Вар. 1368	Вар. 1408	Вар. 1448	Вар. 1488	Вар. 1528	Вар. 1568	Вар. 1608	Вар. 1648	Вар. 1688	Вар. 1728
	ПММ 9 мкг/л	Вар. 1329	Вар. 1369	Вар. 1409	Вар. 1449	Вар. 1489	Вар. 1529	Вар. 1569	Вар. 1609	Вар. 1649	Вар. 1689	Вар. 1729
	ПММ 10 мкг/л	Вар. 1330	Вар. 1370	Вар. 1410	Вар. 1450	Вар. 1490	Вар. 1530	Вар. 1570	Вар. 1610	Вар. 1650	Вар. 1690	Вар. 1730
	Приблизительно 1 мкг/л	Вар. 1331	Вар. 1371	Вар. 1411	Вар. 1451	Вар. 1491	Вар. 1531	Вар. 1571	Вар. 1611	Вар. 1651	Вар. 1691	Вар. 1731
	Приблизительно 1,5 мкг/л	Вар. 1332	Вар. 1372	Вар. 1412	Вар. 1452	Вар. 1492	Вар. 1532	Вар. 1572	Вар. 1612	Вар. 1652	Вар. 1692	Вар. 1732
	Приблизительно 2 мкг/л	Вар. 1333	Вар. 1373	Вар. 1413	Вар. 1453	Вар. 1493	Вар. 1533	Вар. 1573	Вар. 1613	Вар. 1653	Вар. 1693	Вар. 1733
	Приблизительно 2,5 мкг/л	Вар. 1334	Вар. 1374	Вар. 1414	Вар. 1454	Вар. 1494	Вар. 1534	Вар. 1574	Вар. 1614	Вар. 1654	Вар. 1694	Вар. 1734
	Приблизительно 3 мкг/л	Вар. 1335	Вар. 1375	Вар. 1415	Вар. 1455	Вар. 1495	Вар. 1535	Вар. 1575	Вар. 1615	Вар. 1655	Вар. 1695	Вар. 1735
	Приблизительно 3,5 мкг/л	Вар. 1336	Вар. 1376	Вар. 1416	Вар. 1456	Вар. 1496	Вар. 1536	Вар. 1576	Вар. 1616	Вар. 1656	Вар. 1696	Вар. 1736
	Приблизительно 4 мкг/л	Вар. 1337	Вар. 1377	Вар. 1417	Вар. 1457	Вар. 1497	Вар. 1537	Вар. 1577	Вар. 1617	Вар. 1657	Вар. 1697	Вар. 1737
	Приблизительно 4,5 мкг/л	Вар. 1338	Вар. 1378	Вар. 1418	Вар. 1458	Вар. 1498	Вар. 1538	Вар. 1578	Вар. 1618	Вар. 1658	Вар. 1698	Вар. 1738
	Приблизительно 5 мкг/л	Вар. 1339	Вар. 1379	Вар. 1419	Вар. 1459	Вар. 1499	Вар. 1539	Вар. 1579	Вар. 1619	Вар. 1659	Вар. 1699	Вар. 1739
	Приблизительно 5,5 мкг/л	Вар. 1340	Вар. 1380	Вар. 1420	Вар. 1460	Вар. 1500	Вар. 1540	Вар. 1580	Вар. 1620	Вар. 1660	Вар. 1700	Вар. 1740
	Приблизительно 6 мкг/л	Вар. 1341	Вар. 1381	Вар. 1421	Вар. 1461	Вар. 1501	Вар. 1541	Вар. 1581	Вар. 1621	Вар. 1661	Вар. 1701	Вар. 1741
	Приблизительно 7 мкг/л	Вар. 1342	Вар. 1382	Вар. 1422	Вар. 1462	Вар. 1502	Вар. 1542	Вар. 1582	Вар. 1622	Вар. 1662	Вар. 1702	Вар. 1742
	Приблизительно 8 мкг/л	Вар. 1343	Вар. 1383	Вар. 1423	Вар. 1463	Вар. 1503	Вар. 1543	Вар. 1583	Вар. 1623	Вар. 1663	Вар. 1703	Вар. 1743
	Приблизительно 9 мкг/л	Вар. 1344	Вар. 1384	Вар. 1424	Вар. 1464	Вар. 1504	Вар. 1544	Вар. 1584	Вар. 1624	Вар. 1664	Вар. 1704	Вар. 1744
	Приблизительно 10 мкг/л	Вар. 1345	Вар. 1385	Вар. 1425	Вар. 1465	Вар. 1505	Вар. 1545	Вар. 1585	Вар. 1625	Вар. 1665	Вар. 1705	Вар. 1745
	1–20 мкг/л	Вар. 1346	Вар. 1386	Вар. 1426	Вар. 1466	Вар. 1506	Вар. 1546	Вар. 1586	Вар. 1626	Вар. 1666	Вар. 1706	Вар. 1746
	2–20 мкг/л	Вар. 1347	Вар. 1387	Вар. 1427	Вар. 1467	Вар. 1507	Вар. 1547	Вар. 1587	Вар. 1627	Вар. 1667	Вар. 1707	Вар. 1747

1–10 мкг/л	Var. 1348	Var. 1388	Var. 1428	Var. 1468	Var. 1508	Var. 1548	Var. 1588	Var. 1628	Var. 1668	Var. 1708	Var. 1748
2–10 мкг/л	Var. 1349	Var. 1389	Var. 1429	Var. 1469	Var. 1509	Var. 1549	Var. 1589	Var. 1629	Var. 1669	Var. 1709	Var. 1749
1–6 мкг/л	Var. 1350	Var. 1390	Var. 1430	Var. 1470	Var. 1510	Var. 1550	Var. 1590	Var. 1630	Var. 1670	Var. 1710	Var. 1750
2–6 мкг/л	Var. 1351	Var. 1391	Var. 1431	Var. 1471	Var. 1511	Var. 1551	Var. 1591	Var. 1631	Var. 1671	Var. 1711	Var. 1751
3–6 мкг/л	Var. 1352	Var. 1392	Var. 1432	Var. 1472	Var. 1512	Var. 1552	Var. 1592	Var. 1632	Var. 1672	Var. 1712	Var. 1752
4–6 мкг/л	Var. 1353	Var. 1393	Var. 1433	Var. 1473	Var. 1513	Var. 1553	Var. 1593	Var. 1633	Var. 1673	Var. 1713	Var. 1753
1–5 мкг/л	Var. 1354	Var. 1394	Var. 1434	Var. 1474	Var. 1514	Var. 1554	Var. 1594	Var. 1634	Var. 1674	Var. 1714	Var. 1754
2–5 мкг/л	Var. 1355	Var. 1395	Var. 1435	Var. 1475	Var. 1515	Var. 1555	Var. 1595	Var. 1635	Var. 1675	Var. 1715	Var. 1755
3–5 мкг/л	Var. 1356	Var. 1396	Var. 1436	Var. 1476	Var. 1516	Var. 1556	Var. 1596	Var. 1636	Var. 1676	Var. 1716	Var. 1756
4–5 мкг/л	Var. 1357	Var. 1397	Var. 1437	Var. 1477	Var. 1517	Var. 1557	Var. 1597	Var. 1637	Var. 1677	Var. 1717	Var. 1757
1–4 мкг/л	Var. 1358	Var. 1398	Var. 1438	Var. 1478	Var. 1518	Var. 1558	Var. 1598	Var. 1638	Var. 1678	Var. 1718	Var. 1758
2–4 мкг/л	Var. 1359	Var. 1399	Var. 1439	Var. 1479	Var. 1519	Var. 1559	Var. 1599	Var. 1639	Var. 1679	Var. 1719	Var. 1759
3–4 мкг/л	Var. 1360	Var. 1400	Var. 1440	Var. 1480	Var. 1520	Var. 1560	Var. 1600	Var. 1640	Var. 1680	Var. 1720	Var. 1760

*ПММ = по меньшей мере

Согласно одному из вариантов реализации раствор культуры клеток также содержит низкую концентрацию аммония. Согласно одному из вариантов реализации указанная культуральная среда содержит аммоний в концентрации менее чем 10 мМ, и медь и никотинамид в концентрациях согласно любому из вариантов 1321-1760, приведенных в табл.4. Согласно конкретному варианту реализации концентрацию аммония поддерживают на уровне не выше 10 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно предпочтительному варианту реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации не выше 6 мМ, и медь и никотинамид в концентрациях согласно любому из вариантов 1321-1760, приведенных в табл.4. Согласно конкретному варианту реализации концентрацию аммония поддерживают на уровне не выше 6 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно другому предпочтительному варианту реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации не выше 5 мМ, и медь и никотинамид в концентрациях согласно любому из вариантов 1321-1760, приведенных в табл.4. Согласно конкретному варианту реализации концентрацию аммония поддерживают на уровне не выше 5 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно другому предпочтительному варианту реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации не выше 4 мМ, и медь и никотинамид в концентрациях согласно любому из вариантов 1321-1760, приведенных в табл.4. Согласно конкретному варианту реализации концентрацию аммония поддерживают на уровне не выше 4 мМ в течение по меньшей мере 7 дней. Согласно другим вариантам реализации раствор культуры клеток содержит аммоний в концентрации не выше 10 мМ, или не выше 9 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 гА13).

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

Согласно одному из вариантов реализации в среду для клеточной культуры добавляют медь, кальций и никотинамид. Согласно конкретному варианту реализации культуральная среда содержит никоти-

намид 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 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.

III. Способы получения факторов крови с высокой удельной активностью А. Способы культивирования клеток.

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

Согласно определенным вариантам реализации способы согласно настоящему изобретению могут включать применение систем культивирования клеток в периодическом или непрерывном режиме. Например, в случае использования периодических культур клеток к ним может применяться режим однократного периодического культивирования, подпитываемого культивирования или повторного периодического культивирования. Сходным образом, к непрерывным культурам клеток может применяться, например, перфузионный, турбидостатический или 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.

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

Непрерывная культура может представлять собой суспензионную культуру, непрерывно получающую питательные вещества за счет притока свежей среды, где, как правило, поддерживается постоянный объем культуры за счет сопутствующего удаления отработанной среды. Согласно 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 гVWF или гA13 выделяют после сбора супернатанта непрерывной культуры. Типовой способ непрерывного культивирования клеток описан в WO/2011/012725 (Grillberger et al.), содержание которой включено в настоящее изобретение

посредством ссылки во всей полноте для любых целей.

При перфузионном культивировании извлеченная среда бедна клетками, которые остаются в культуральном сосуде, например, за счет применения способов фильтрации или центрифугирования, приводящих к повторному внесению клеток в культуру. Однако, как правило, используемые для фильтрации задерживают не 100% клеток, и таким образом часть их удаляется при извлечении среды. Очень высокие скорости роста для культивирования в режиме перфузии не критичны, так как большая часть клеток остается в культуральном сосуде. Согласно определенным вариантам реализации rVWF или rA13 выделяют после сбора супернатанта перфузионной культуры.

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

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

Клетки, экспрессирующие vWF и/или 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 дорастивать клетки до некоторой биомассы на сферических микроносителях, и пересевать указанные клетки при достижении ими конечной для ферментера биомассы, перед получением экспрессированного белка, на пористый микроноситель, или наоборот. Подходящие сферические микроносители могут включать микроносители с гладкой поверхностью, такие как Cytodex™ 1, Cytodex™ 2, и Cytodex™ 3 (GE Healthcare) и крупнопористые микроносители такие как Cytopore™ 1, Cytopore™ 2, Cytoline™ 1 и Cytoline™ 2 (GE Healthcare).

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

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 4×10^7 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.

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.

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.

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

В. Способы получения высокомолекулярного рекомбинантного vWF.

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

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

Согласно одному из вариантов реализации настоящее изобретение обеспечивает способ получения

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

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.

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 реали-

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 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.

- 33 -

одному из вариантов реализации концентрацию аммония в культуре клеток поддерживают на низком уровне на протяжении процесса (т.е. в течение всего времени, на протяжении которого указанная культура используется для получения rVWF). Согласно предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью rVWF, составляющей по меньшей мере 50 мЕ/мкг rVWF. Согласно более предпочтительному варианту реализации отделенный супернатант обладает удельной ристоцетин-кофакторной активностью rVWF, составляющей по меньшей мере 70 мЕ/мкг rVWF.

Согласно одному из вариантов реализации 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.

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.

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 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 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.

зом, что происходит экспрессия и экскреция rVWF из клеток в культуральный супернатант; (е) мониторинга концентрации аммония в указанном культуральном супернатанте; и (ф) 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.

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.

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.

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.

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

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

собой по меньшей мере биологически активную часть vWF.

Для экспрессии указанного vWF могут применяться разнообразные векторы; они могут быть выбраны из эукариотических экспрессионных векторов. Примеры векторов для эукариотической экспрессии включают: (i) векторы для экспрессии в дрожжах, такие как pAO, pPIC, pYES, pMET, с применением таких промоторов, как AOX1, GAP, GAL1, AUG1, и т.п.; (ii) векторы для экспрессии в клетках насекомых, такие как pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC и т.п. с применением таких промоторов, как PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh и т.п. и (iii) векторы для экспрессии в клетках млекопитающих, такие как pSVL, pCMV, pRc/RSV, pкДНК3, pBPV и т.п. и векторы, происходящие из вирусных систем, таких как вирус осповакцины, аденоассоциированные вирусы, герпесвирусы, ретровирусы и т.п. с применением таких промоторов, как CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV и β -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 настоящее изобретение посредством ссылки во всей полноте для любых целей.

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.

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

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

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

С. Способы получения рекомбинантного ADAMTS13 (A13).

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

Согласно одному из вариантов реализации настоящее изобретение обеспечивает способ получения композиции рекомбинантного ADAMTS13 (rA13); указанный способ включает этапы: (a) обеспечения основных сред для культуры клеток; (b) добавления в основные среды для клеточных культур меди до конечной концентрации меди, составляющей по меньшей мере 1,0 мкг/л; (c) обеспечения одной или более клеток, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок rA13; (d) культивирования указанной одной или более клеток в среде для клеточных культур с добавлением меди таким образом, что происходит экспрессия и экскреция rA13 из клеток в культуральный супернатант; и (e) отделения по меньшей мере части указанного культурального супернатанта, при этом в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 1500 единиц активности FRETS-VWF73 на литр дополненных основ-

ных сред для клеточных культур в день (т.е. 1500 единиц FRET-S-VWF73 активности в день на литр культуры клеток; P FRET-S). 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 FRET-S-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно более предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2500 единиц активности FRET-S-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 3000 единиц активности FRET-S-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно определенным вариантам реализации указанные способы обеспечивают устойчивое увеличение объемной продуктивности FRET-S-VWF73 (P FRET-S). Например, согласно определенным вариантам реализации выделяют по меньшей мере 1500 единиц активности FRET-S-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 FRET-S-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 FRET-S-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 FRET-S-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.

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

Согласно одному варианту реализации описанных выше способов культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 800 мЕ FRET-S-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 FRET-S-VWF73 активности на 10^6 клеток культуры в день. Согласно более предпочтительному варианту реализации культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 1,2 Е FRET-S-VWF73 активности на 10^6 клеток культуры в день. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 1,4 Е FRET-S-VWF73 активности на 10^6 клеток культуры в день. Согласно определенным вариантам реализации указанные способы обеспечивают устойчивое увеличение удельной продуктивности FRET-S-VWF73 на клетку (q Frets). Например, согласно определенным вариантам реализации культивирование клеток позволяет получить по меньшей мере 800 мЕ FRET-S-VWF73 активности на 10^6 клеток культуры ежедневно 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 гA13). Согласно конкретному варианту реализации культуральный раствор содержит медь и аммоний в концентрации согласно любому из вариантов 1-440, приведенных в табл.1.

Согласно одному из вариантов реализации настоящее изобретение обеспечивает способ получения композиции рекомбинантного ADAMTS13 (гA13); указанный способ включает этапы: (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 гA13; (d) культивирования указанной одной или более клеток в среде для клеточных культур с добавлением меди таким образом, что происходит экспрессия и экскреция гA13 из клеток в культуральный супернатант; и (е) отделения по меньшей мере части указанного культурального супернатанта, при этом в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 1500 единиц активности FRETs-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно одному из вариантов реализации указанная культуральная среда содержит по меньшей мере 1 мкг/л меди и по меньшей мере 2 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 FRETs-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно более предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2500 единиц активности FRETs-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 3000 единиц активности FRETs-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день.

Согласно одному из вариантов реализации настоящее изобретение обеспечивает способ получения композиции рекомбинантного ADAMTS13 (гA13); 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 гA13; (d) культивирования указанной одной или более клеток в среде для клеточных культур с добавлением меди таким образом, что происходит экспрессия и экскреция гA13 из клеток в культуральный супернатант; и (е) отделения по меньшей мере части указанного культурального супернатанта, при этом в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 1500 единиц активности FRETs-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно одному из вариантов реализации указанная культуральная среда содержит по меньшей мере 1 мкг/л меди и по меньшей мере 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 кальций в концентрации согласно любому из вариантов 881-1320, при-

веденных в табл.3. Согласно предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2000 единиц активности FRETTS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно более предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2500 единиц активности FRETTS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 3000 единиц активности FRETTS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день.

Согласно одному из вариантов реализации настоящее изобретение обеспечивает способ получения композиции рекомбинантного ADAMTS13 (гA13); 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 гA13; (d) культивирования указанной одной или более клеток в среде для клеточных культур с добавлением меди таким образом, что происходит экспрессия и экскреция гA13 из клеток в культуральный супернатант; и (е) отделения по меньшей мере части указанного культурального супернатанта, при этом в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 1500 единиц активности FRETTS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно одному из вариантов реализации 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 FRETTS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно более предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2500 единиц активности FRETTS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 3000 единиц активности FRETTS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день.

Согласно одному из вариантов реализации настоящее изобретение обеспечивает способ получения композиции рекомбинантного ADAMTS13 (гA13); 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 гA13; (d) культивирования указанной одной или более клеток в среде для клеточных культур с добавлением меди таким образом, что происходит экспрессия и экскреция гA13 из клеток в культуральный супернатант; и (е) отделения по меньшей мере части указанного культурального супернатанта, при этом в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 1500 единиц активности FRETTS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно одному из вариантов реализации 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 FRETTS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно более предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2500 единиц активности FRETTS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 3000 единиц активности FRETTS-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день.

Согласно одному из вариантов реализации настоящее изобретение обеспечивает способ получения композиции рекомбинантного ADAMTS13 (rA13); указанный способ включает этапы: (а) обеспечения основных сред для культуры клеток; (б) добавления в основные среды для клеточных культур меди, цинка и никотинамида; (с) обеспечения одной или более клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую белок rA13; (д) 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 FRETs-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно одному из вариантов реализации указанная среда для клеточной культуры содержит никотинамид в концентрации по меньшей мере 2 мг/мл, и медь и цинк в концентрациях согласно любому из вариантов 441-880, приведенных в табл.2. Согласно другому конкретному варианту реализации указанная культуральная среда содержит никотинамид в концентрации по меньшей мере 7 мг/мл 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 FRETs-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно более предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2500 единиц активности FRETs-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 3000 единиц активности FRETs-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день.

Согласно одному из вариантов реализации настоящее изобретение обеспечивает способ получения композиции рекомбинантного ADAMTS13 (rA13); указанный способ включает этапы: (а) обеспечения основных сред для культуры клеток; (б) добавления в основные среды для клеточных культур меди, кальция и никотинамида; (с) обеспечения одной или более клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую белок rA13; (д) 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 FRETs-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 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 FRETs-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно более предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 2500 единиц активности FRETs-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации в отделенном культуральном супернатанте присутствует по меньшей мере 3000 единиц активности FRETs-VWF73 на литр дополненных основных сред для клеточных культур в день.

Рекомбинантные белки ADAMTS могут быть получены посредством осуществления экспрессии в любой подходящей прокариотической или эукариотической системе-хозяине. Примеры эукариотических клеток включают, без ограничения, клетки млекопитающих, такие как CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Ner, и HerpG2; 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 ре-

лизации указанная клеточная линия представляет собой клеточную линию CHO, ВНК или НЕК. Согласно предпочтительному варианту реализации клеточная линия представляет собой клеточную линию CHO. Согласно конкретному варианту реализации клоны CHO, способные к стабильной экспрессии gA13, получают ко-трансфекцией клетки CHO кодирующими последовательностями gA13 и дигидрофолатредуктазы (например, мышиного гена *dhfr*) и отбором при росте в присутствии возрастающих уровней метотрексата.

Согласно одному из вариантов реализации указанные клетки могут представлять собой любые клетки млекопитающих, пригодные для культивирования, предпочтительно в ходе производственного процесса (т.е. по меньшей мере в 10 л, предпочтительно по меньшей мере в 100 л), для получения требуемого белка ADAMTS, такого как ADAMTS13. Примеры включают линию клеток почки обезьяны CV1 трансформированную SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линию эмбриональных клеток почек человека (клетки 293 или 293 субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al, J. Gen Virol, 36:59 (1977)); клетки почки новорожденного хомяка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомячка/-DHFR, такие как субклон DUKX-B11 (CHO, Uriaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, Biol. Reprod, 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HeLa, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крыс Буффало (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); опухоли молочной железы мышей (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather et al, Annals N. Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); клетки MRC 5; клетки FS4; и линию гепатомы человека (Hep G2). Предпочтительно, клеточная линия представляет собой линию клеток грызунов, в частности, линию клеток хомяка, такую как CHO или ВНК.

Значительное число векторов может применяться для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS 13) и может быть выбрано из эукариотических и прокариотических экспрессионных векторов. Согласно определенным вариантам реализации плазмидный вектор предназначен для применения в экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS 13). 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. Плазмида содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS 13), функционально связанную с одной или более контрольной последовательностью, например, промотором.

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

Согласно другому предпочтительному варианту реализации стабильные НЕК293 клетки получают, трансфицируя их конструкцией, содержащей селективируемый маркер устойчивости к гиромизину, и отбирая трансформанты по устойчивости к антибиотику.

Способность определенных вирусов инфицировать клетки или проникать в клетки посредством опосредованного рецепторами эндоцитоза, встраиваться в геном клетки-хозяина и стабильно и эффективно экспрессировать вирусные гены, делает их привлекательными кандидатами для переноса чужеродных нуклеиновых кислот в клетки (например, клетки млекопитающих). Соответственно, согласно определенным вариантам реализации вирусный вектор применяют для введения нуклеотидной последовательности, кодирующей белок ADAMTS (например, ADAMTS 13) в клетку-хозяина для экспрессии. Указанный вирусный вектор должен содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS 13), функционально связанную с одной или более контрольной последовательностью, например, промотором. Как вариант, указанный вирусный вектор может не содержать контрольную последовательность, вместо этого используя контрольную последовательность клетки-хозяина для управления экспрессией белка ADAMTS. Неограничивающие примеры вирусных векторов, которые могут применяться для доставки нуклеиновой кислоты, включают аденовирусные векторы, AAV-векторы и ретровирусные векторы.

Согласно одному из вариантов реализации аденовирусный экспрессионный вектор включает конструкции, содержащие аденовирусные последовательности, достаточные для осуществления упаковки указанной конструкции и гарантированной экспрессии клонированной в нее конструкции ADAMTS.

Аденовирусные векторы позволяют вводить чужеродные последовательности размером до 7 т.п.н. (Grunhaus et al., Seminar in Virology, 200(2): 53 5-546, 1992)).

Согласно другому варианту реализации аденоассоциированный вирус (AAV) может применяться для введения нуклеотидной последовательности, кодирующей белок ADAMTS (например, ADAMTS 13), 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, Natl Immunol, 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 настоящее изобретение посредством ссылки во всей полноте и для любых целей.

Согласно одному из вариантов реализации ретровирусный экспрессионный вектор может применяться для введения нуклеотидной последовательности, кодирующей белок ADAMTS (например, ADAMTS 13), 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).

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 β -актина. Типовой вектор для экспрессии rA13 описан у Plaimauer et al. (Blood. 2002 Nov 15;100(10):3626-32. Epub 2002 Jul 12); содержание указанного источника включено в настоящее изобретение посредством ссылки во всей полноте для любых целей.

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

IV. Конкретные варианты реализации.

A. Рекомбинантный фактор фон Виллебранда (rVWF).

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, способствуют 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 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.

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 кле-

точной культуры с повышенной концентрацией меди и/или супернатант культуры клеток с низкой концентрацией аммония (NH_4^+). Согласно настоящему изобретению также предложены способы культивирования клеток в условиях клеточной культуры для экспрессии высокомолекулярного vWF с высокой удельной активностью.

Согласно одному из аспектов настоящее изобретение обеспечивает раствор культуры клеток для получения высокомолекулярного 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.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к условиям культивирования клеток для получения рекомбинантного высокомолекулярного vWF, находящегося в высокомультимерной форме с высокой удельной активностью. Условия культивирования клеток согласно настоящему изобретению могут включать, например, среду для клеточной культуры с повышенной концентрацией меди и супернатант культуры клеток с низкой концентрацией аммония (NH_4^+). Согласно настоящему изобретению также предложены способы культивирования клеток в условиях клеточной культуры для экспрессии высокомолекулярного vWF с высокой удельной активностью.

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

Согласно другому аспекту настоящее изобретение включает способ получения высокомолекулярного рекомбинантного vWF, включающий а) обеспечение культуры клеток; б) введение последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей vWF; в) отбор клеток, несущих указанную последовательность нуклеиновой кислоты; и, д) осуществление экспрессии vWF в указанных клетках в условиях клеточной культуры, включающих среду для клеточной культуры, содержащую медь в концентрации по меньшей мере приблизительно 2,4 мкг/л, и супернатант культуры клеток, содержащий аммоний в концентрации менее чем приблизительно 10 мМ, причем указанный vWF представляет собой высокомультимерный vWF, содержащий от приблизительно до приблизительно 22 димеров и обладающий удельной ристоцетиновой активностью по меньшей мере приблизительно 30 мЕ/мкг. Согласно одному варианту реализации супернатанта культуры клеток, описанной выше, по меньшей мере 10% rVWF присутствует в виде высокомолекулярного мультимера VWF из более чем 10 димеров. Согласно конкретному варианту реализации по меньшей мере 15% rVWF присутствует в виде высокомолекулярного мультимера VWF из более чем 10 димеров. Согласно другому конкретному варианту реализации по меньшей мере 20% rVWF присутствует в виде высокомолекулярного мультимера VWF из более чем 10 димеров. Согласно другому конкретному варианту реализации по меньшей мере 25% rVWF присутствует в виде высокомолекулярного мультимера VWF из более чем 10 димеров. Согласно другому конкретному варианту реализации по

меньшей мере 30% rVWF присутствует в виде высокомолекулярного мультимера VWF из более чем 10 димеров. Согласно некоторым вариантам реализации клетки, которые могут быть взяты из непрерывной клеточной линии, могут включать клетки млекопитающих, такие как клетки CHO. Согласно определенным вариантам реализации концентрация меди может составлять по меньшей мере приблизительно 4 мкг/л, либо концентрация меди может варьировать от приблизительно 2,4 мкг/л до приблизительно 20 мкг/л. Согласно некоторым вариантам реализации среды для клеточных культур содержат средовую добавку, содержащую медь. Согласно определенным вариантам реализации указанная средовая добавка может содержать гидролизат или соль меди, хелат меди или их комбинации. Согласно некоторым вариантам реализации указанная соль меди может включать сульфат меди, ацетат меди, карбонат меди, хлорид меди, гидроксид меди, нитрат меди или оксид меди.

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

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

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

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

гласно другому конкретному варианту реализации по меньшей мере 30% гVWF присутствует в виде высокомолекулярного мультимера VWF из более чем 10 димеров.

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

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций, гVWF 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.

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

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

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций уровень NH_4^+ в указанной культуре поддерживают на уровне концентрации ниже 4 мМ.

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

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

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

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

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

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций указанную композицию лиофилизируют.

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

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

Согласно приведенному в настоящем изобретении описанию в соответствии с настоящим изобретением получен неожиданный результат, состоящий в том, что повышенная концентрация меди в культуре клеток среды позволяет получать высокомолекулярный vWF с высокой удельной активностью. Среды для клеточных культур, содержащие медь в концентрации, например, выше, чем приблизительно

2,4 мкг/л, могут повышать выход рекомбинантного мультимерного vWF по сравнению с не содержащими медь средами. Согласно определенным вариантам реализации процент мультимерного vWF (т.е. rVWF, содержащего по меньшей мере 2 димера) может быть выше, чем приблизительно 50%, или выше, чем приблизительно 75%, или выше, чем приблизительно 90%. Уровень мультимеризации vWF может быть проанализирован с применением стандартных техник, таких как, например, in электрофорез в агарозе в невосстанавливающих условиях.

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

В. Рекомбинантный ADAMTS13 (rA13).

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

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

Рекомбинантный ADAMTS 13 (A13) экспрессировали в клетках млекопитающих и прежде, однако удельная активность широко варьирует в зависимости от условий культивирования клеток. Было обнаружено, что многие коммерчески доступные культуральные среды непригодны для экспрессии rA13 с высокой удельной активностью, выражаемой как отношение активности, измеренной посредством анализа FRETs-VWF73, к содержанию антигена, согласно оценке с применением ELISA. Согласно одному аспекту способы, предложенные согласно настоящему изобретению, основаны на нескольких полезных открытиях, позволяющих осуществлять экспрессию в культуре клеток белка rA13, обладающего повышенными уровнями общей и удельной активности.

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

Согласно одному из аспектов в соответствии с настоящим изобретением предложена композиция, содержащая рекомбинантный ADAMTS 13 (rA13), обладающий удельной FRETs-VWF активностью, составляющей по меньшей мере 1600 мЕ/мкг.

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

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

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

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций медь представлена в виде соли меди, хелата меди или их комбинации. Согласно конкретному варианту реализации указанная соль

меди выбрана из группы, состоящей из сульфата меди, ацетата меди, карбоната меди, хлорид меди, гидроксид меди, нитрата меди и оксида меди.

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

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

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций уровень NH_4^+ в указанной культуре поддерживают на уровне концентрации ниже 5 мМ.

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций уровень NH_4^+ в указанной культуре поддерживают на уровне концентрации ниже 4 мМ.

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

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

Согласно одному из вариантов реализации вышеописанных композиций указанную композицию лиофилизируют.

V. Составы.

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

Способы получения фармацевтических составов может включать один или более следующий этап: добавление стабилизирующего агента согласно описанию в настоящем изобретении 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 настоящем изобретении описанию, к указанной смеси перед лиофилизацией. Лيوфилизированный 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.

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

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

аспектам указанные водные суспензии также содержат один или более консервант, например, и без ограничения, этил-, или *n*-пропил-, *p*-гидроксibenзоат.

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

Указанные фармацевтические составы вводят внутривенно, перорально, местно, трансдермально, парентерально, путем ингаляции, вагинально, ректально или путем внутричерепной инъекции. Используемый в настоящем изобретении термин "парентеральный" включает подкожные инъекции, внутривенные, внутримышечные, интракостеральные инъекции или инфузионные техники. Также включено введение путем внутривенной, внутрикостной, внутримышечной, интрамаммарной, внутривисцеральной, интраабдоминальной, ретроульбарной, внутривисцеральной инъекции и/или хирургической имплантации в конкретный участок. Как правило, композиции по существу не содержат пирогенов, а также других примесей, которые могут быть вредными для реципиента.

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

Согласно одному аспекту составы согласно настоящему изобретению вводят сначала в виде 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 настоящее изобретение посредством ссылки. Такие составы влияют на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость клиренса *in vivo* введенных агентов. В зависимости от пути введения подходящую дозу вычисляют в соответствии с массой тела, площадью поверхности тела или размером органа. Подходящие дозировки могут быть уточнены посредством стандартных способов определения уровней дозы в крови в сочетании с подходящими данными о зависимости доза-эффект. Окончательный режим дозирования определяет лечащий врач с учетом различных факторов, модифицирующих действие лекарственных средств, например, удельной активности лекарственного средства, тяжести поражения и отклика пациента, возраста, состояния, массы тела, пола и рациона питания пациента, тяжести любой инфекции, времени введения и других клинических факторов. Например, типичная доза рекомбинантного vWF согласно настоящему изобретению составляет приблизительно 50 Е/кг, что равно 500 мкг/кг. По мере проведения исследований появляется дополнительная информация относительно подходящих уровней дозировок и продолжительности лечения различных заболеваний и состояний.

VI. Способы лечения.

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

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

Согласно одному из вариантов реализации в соответствии с настоящим изобретением предложены способы лечения или предотвращения заболеваний или состояний, связанных с дисфункцией ADAMTS13 или VWF. Согласно дальнейшему варианту реализации фармацевтические составы, содер-

жащие 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 гA13, предложенной в настоящем изобретении. 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 гADAMTS13 согласно настоящему изобретению нуждающемуся в этом пациенту.

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

Неограничивающие примеры расстройств, связанных с инфарктом, включают без ограничения 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.

VII. Примеры.

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

Пример 1.

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

Рекомбинантные клетки CHO, экспрессирующие vWF, культивировали в непрерывной клеточной культуре таким образом, что уровни аммония (NH_4^+) находились на уровне концентрации менее чем приблизительно 10 мМ. Было обнаружено, что системы производства, обеспечивающие непрерывное поступление среды (например, перфузионные или хеMOSTАТИЧЕСКИЕ культуры) предпочтительны, так как стандартные техники периодических или подпитываемых культур приводят к высоким концентрациям NH_4^+ в конце культивирования. В конце культивирования выделяли высокомультимерный vWF и измеряли удельную ристоцетин-кофакторную активность vWF.

Пример 2.

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

Таблица 5

Состав культуральных сред BAV-SP

Среда BAV-SP	
Компоненты	мг/л
Аминокислоты	
L-Аланин	4,45
L-Аргинин HCl	147,50
L-Аспарагин-H ₂ O	30,21
L-Аспарагиновая кислота	6,65
L-Цистеин HCl-H ₂ O	32,55
L-Цистин 2HCl	57,35
L-Глутаминовая кислота	7,35
Глицин	18,75
L-Гистидин-H ₂ O HCl	31,48
Гидроксид-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 ₂ O	55,79
L-Валин	52,85
Витамин	
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
Неорганические соли	
Кальция хлорид (CaCl ₂)	116,600
Сульфат меди (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0,0013
Нитрат железа (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	0,050
Сульфат железа (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	0,417
Хлорид магния (MgCl ₂)	28,640
Сульфат магния (MgSO ₄)	48,840
Хлорид калия (KCl)	311,800
Хлорид натрия (NaCl)	6995,500
Фосфат натрия (Na ₂ HPO ₄)	71,020
Фосфат натрия (NaH ₂ PO ₄)	62,500
Гептагидрат сульфата цинка (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	0,432
Селенит натрия	0,0131
Другие	
D-Глюкоза	3151
Линолевая кислота	0,042
Липоевая кислота	0,105
Путресцин 2HCl	0,081
Тимидин	0,365
Гипоксантин Na	2,390
Пируват натрия	55,000

Таблица 6

Состав добавки для BAV-SP

Компоненты конечного состава	
L-Глутамин	600,00
Этаноламин	1,530
Synprotonic F68	250,000
Бикарбонат натрия (NaHCO ₃)	2000,000
Соевый пептон	4000,00
Общий состав	18596,8

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

Неожиданно было обнаружено, что культуры клеток, росшие при высоких концентрациях меди, давали супернатанты, имеющие значительно более высокую общую и удельную rVWF-активность (ср. результаты в табл. 7 и 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/10 мкг rVWF к 62 МЕ/10 мкг rVWF).

Как видно из табл. 7 и 8, общая и удельная ристоцетин-кофакторная активность культуры с высоким содержанием меди была в два раза выше таковой культуры с низким содержанием меди, на 1 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-й день периодического культивирования присутствовала низкая относительно концентрации низкомолекулярных видов rVWF концентрация высокомолекулярного rVWF, и также что указанная относительная концентрация снижалась с течением времени (фиг. 1A и 1B). Напротив, добавление в культуральную среду Cu²⁺ 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. 1A и 1B). Результаты денситометрии агарозного электрофоретического геля, приведенные на фиг. 1B, 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. 1A); примечательно, что эта популяция опускалась до всего лишь 4% на день 5 периодического культивирования (образец "дня 7" в полосе 6). Напротив, в условиях высокого содержания меди относительное количество мультимеров VWF, состоящих из более чем 10 димеров, стабильно составляет около 30% на протяжении дня 4 в периодической культуре ("день 3"- "день 6" в полосах 7-10; 28-31,4%).

Примечательно, что начиная с 5-го дня периодического культивирования культуры с высоким содержанием меди, когда уровни NH₄⁺ 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%.

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 NH₄⁺ в культуре клеток и снижением ристоцетин-кофакторной активности rVWF и выработки высокомолекулярного мультимерного rVWF.

Таблица 7

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

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

Таблица 8

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

день периодического культивирования	Количество клеток [10E6 клеток/мл]	NH ₄ ⁺ [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.

Рекомбинантный фактор VIII (гFVIII) и фактор фон Виллебранда (гVWF) 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 гVWF применяли основные среды BAV-SP. Указанные основные среды содержали 0,3 мкг/л меди и добавленный соевый гидролизат, что давало дополнительные 0,7 мкг/л меди с получением конечной концентрации меди 1,0 мкг/л. Для сравнения в периодических культурах применяли среды BAV-SP также с добавлением дополнительных 3,3 мкг/л Cu²⁺, 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.

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

Таблица 9

Средние данные по экспрессии гVWF в хеостатической культуре клеток на протяжении недель 2 и 3

Количество клеток	Концентрация меди	Количество клеток [10E6 клеток/мл]	NH ₄ ⁺ [мМ]	Жизнеспособность [%]	vWF ELISA [мкг/мл]	Ристоцетин [МЕ/мл]	удельная активность [мЕ/10мкг]
большое	низкая	2,88	3,88	97,74	44,56	0,10	21,62
большое	высокая	2,79	4,04	98,25	38,38	0,19	53,11
маленькое	низкая	1,55	3,33	98,63	18,96	0,10	50,16
маленькое	высокая	1,43	3,17	98,59	11,76	0,70	598,76

Таблица 10

Экспрессия гVWF в хемотатической культуре клеток в условиях большого количества клеток и низкого уровня меди на протяжении недель 2 и 3

День	Количество клеток [10E6 клеток/мл]	NH ₄ ⁺ [мМ]	Жизнеспособность [%]	vWF ELISA [мкг/мл]	Ристоцетин [МЕ/мл]	удельная активность [мЕ/10мкг]
8	2,54	3,7	98,20	39,8	0,095	23,86934673
9	3,02	4,2	97,40			
10	2,97	3,9	97,90	41,3	0,095	23,00242131
11	2,78					
13	2,91	3,8	97,60	41,7	0,095	22,78177458
14	2,90	3,8	97,40			
15	3,05	3,9	97,70	44,7	0,095	21,25279642
16	2,99	3,8	98,30			
17	2,76	3,9	97,40	55,3	0,095	17,17902351
	2,88	3,88	97,74	44,56	0,10	21,62

Таблица 11

Экспрессия гVWF в хемотатической культуре клеток в условиях большого количества клеток и высоких уровней меди на протяжении недель 2 и 3

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

Таблица 12

Экспрессия гVWF в хемотатической культуре клеток в условиях маленького количества клеток, низкого уровня меди на протяжении недель 2 и 3

День	Количество клеток [10E6 клеток/мл]	NH ₄ ⁺ [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
	1,55	3,33	98,63	18,96	0,10	50,16

Таблица 13

Экспрессия гVWF в хемотростической культуре клеток в условиях маленького количества клеток, высокого уровня меди на протяжении недель 2 и 3

День	Количество клеток [10E6 клеток/мл]	NH ₄ ⁺ [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
	1,43	3,17	98,59	11,76	0,70	598,76

Как показано на фиг. 2А, супернатант, собранный из непрерывной гVWF-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 гVWF-культур клеток, выращенных при высокой плотности клеток в присутствии высоких или низких концентраций меди, и гVWF-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 гVWF с высокой удельной активностью, содержат более низкие NH₄⁺ концентрации, чем культуры, продуцирующие гVWF с низкой удельной активностью. Эти данные также подтверждают корреляцию между концентрацией NH₄⁺ в культуре клеток и удельной активностью гVWF, продуцируемого указанной культурой. Примечательно, что комбинация высокой концентрации меди и низкой концентрации аммония в культуре клеток позволяла добиться значительного повышения активности гVWF.

В соответствии с этим результатом, анализ мультимерного статуса гVWF в хемотростических 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 высокомультимерного vWF (приблизительно 23%-27% в дни CST 8, 17 и 24, полосы 4, 8, и 12, соответственно). Все прочие условия не обеспечивали устойчивого достижения большого количества - более чем 10% vWF, содержащего более чем 10 димеров, на протяжении длительного периода культивирования.

Пример 4.

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

Таблица 14

Состав среды для получения ADAMTS13

DMEM/F12 BESP845	
Аминокислоты	мг/л
L-Аланин	13,3500
L-Аргинин HCl	147,5000
L-Аспарагин-H ₂ O	45,1600
L-Аспарагиновая кислота	19,9500
L-Цистеин HCl-H ₂ O	32,5500
L-Цистин 2HCl	102,3500
L-Глутаминовая кислота	22,0500
Глицин	26,2500
L-Гистидин-H ₂ 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 ₂ O	75,7900
L-Валин	82,8500

соли	мг/л
Кальция хлорид (CaCl ₂)	116,6000
Сульфат меди (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0,0026
Нитрат железа (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	0,0500
Сульфат железа (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	1,0170
Хлорид магния (MgCl ₂)	28,6400
Сульфат магния (MgSO ₄)	48,8400
Хлорид калия (KCl)	311,8000
Хлорид натрия (NaCl)	5495,5000
Na ₂ HPO ₄ Безводный	213,0200
NaH ₂ PO ₄ Безводный	54,3500
Гептагидрат сульфата цинка (ZnSO ₄ ·27H ₂ O)	0,4320
Селенит натрия, безводный	0,0087
Витамины	мг/л
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
другое	мг/л
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
DMEM/F12 BESP845: всего	12738,3
ADAMTS-13 Средовые добавки	мг/л
L-Глутамин	1300,0000
Pluronic F68	1000,0000
Этаноламин	1,5300
ZnSo ₄ *7 H ₂ O	1,0000
Na-Гидрокарбонат	1500,0000
Всего добавок	3802,5
Общее количество ингредиентов	16540,8

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

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

Таблица 15

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

Объем 10 л 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 ²⁺	1,35	1322	1028	1759
1 мкг/л Cu ²⁺	1,64	1962	1247	1690
4 мкг/л Cu ²⁺	2,26	2960	1338	1768

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

Таблица 16

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

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

Понятно, что примеры и варианты реализации, описанные в настоящем изобретении, 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 настоящего изобретения и подпадают под действие прилагаемой формулы изобретения. Все упоминаемые в настоящем изобретении публикации, патенты и патентные заявки включены в настоящее изобретение посредством ссылки во всей полноте для любых целей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция на основе рекомбинантного фактора фон Виллебранда (гVWF), содержащая гVWF, где композиция обладает по меньшей мере 0,5 МЕ ристоцетин-кофакторной активности на мл, где композиция получена способом, содержащим стадии:

- обеспечение основной среды для культивирования клеток;
- добавление в основную среду для культивирования клеток меди до конечной концентрации меди по меньшей мере 2,4 мкг/л;
- обеспечение одной или более клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую гVWF белок;
- культивирование одной или более клеток в культуральной среде, дополненной медью, в результате чего происходит экспрессия и секретирование гVWF клетками в культуральный супернатант, причем концентрацию NH⁴⁺ в супернатанте клеточной культуры поддерживают на уровне ниже 10 мМ; и
- отделение по меньшей мере части культурального супернатанта, где по меньшей мере 20%

rVWF в композиции представлено высокомолекулярными мультимерами VWF, состоящими более чем из 10 димеров.

2. rVWF композиция по п.1, где способ дополнительно содержит стадию дополнения в основную среду для культивирования клеток гидролизата до культивирования одной или более клеток.

3. rVWF композиция по п.2, где гидролизат представляет собой растительный гидролизат.

4. rVWF композиция по п.3, где гидролизат представляет собой соевый гидролизат.

5. rVWF композиция по п.1, где основная среда для культивирования клеток представляет собой не содержащую животных белков культуральную среду.

6. rVWF композиция по п.1, где основная среда для культивирования клеток представляет собой не содержащую белков культуральную среду.

7. rVWF композиция по п.1, где основная среда для культивирования клеток представляет собой культуральную среду с заданным химическим составом.

8. rVWF композиция по п.1, где конечная концентрация меди в основной среде для культивирования клеток, дополненной медью, составляет по меньшей мере 4 мкг/л.

9. rVWF композиция по п.1, где конечная концентрация меди в основной среде для культивирования клеток, дополненной медью, составляет от 2,4 до 20 мкг/л.

10. rVWF композиция по п.1, где основная среда для культивирования клеток, дополненная медью, представлена в форме соли меди, хелата меди или их комбинации.

11. rVWF композиция по п.10, где соль меди выбрана из группы, состоящей из сульфата меди, ацетата меди, карбоната меди, хлорида меди, гидроксида меди, нитрата меди и оксида меди.

12. rVWF композиция по п.1, где одна или более клеток являются клетками млекопитающего.

13. rVWF композиция по п.12, где клетками млекопитающего являются клетки CHO.

14. rVWF композиция по п.1, где культивирование одной или более клеток включает периодическое культивирование указанных клеток.

15. rVWF композиция по п.1, где культивирование одной или более клеток включает непрерывное культивирование указанных клеток.

16. rVWF композиция по п.15, где непрерывное культивирование клеток осуществляют в хемотатическом режиме.

17. rVWF композиция по п.15, где непрерывное культивирование клеток осуществляют в режиме перфузии.

18. rVWF композиция по п.1, где одну или более клеток культивируют по меньшей мере в 100 л дополненной основной среды для клеточных культур.

19. rVWF композиция по п.1, где плотность клеток поддерживают на уровне менее чем $2,5 \times 10^6$ клеток/мл на протяжении этапа культивирования одной или более клеток.

20. rVWF композиция по п.19, где плотность клеток поддерживают на уровне менее чем $2,0 \times 10^6$ клеток/мл на протяжении этапа культивирования одной или более клеток.

21. rVWF композиция по п.19, где плотность клеток поддерживают на уровне менее чем $1,5 \times 10^6$ клеток/мл на протяжении этапа культивирования одной или более клеток.

22. rVWF композиция по п.1, где этап отделения по меньшей мере части культурального супернатанта включает фильтрацию или центрифугирование для удаления клеток из части культурального супернатанта.

23. rVWF композиция по п.1, где по меньшей мере 30% rVWF в супернатанте представлено высокомолекулярными мультимерами VWF, состоящими более чем из 10 димеров.

24. rVWF композиция по п.1, где супернатант содержит высокомолекулярные мультимеры VWF, состоящие из от 14 до 22 димеров.

25. rVWF композиция по п.1, где rVWF коэкспрессируют с рекомбинантным фактором VIII (rFVIII).

26. rVWF композиция по п.25, где способ дополнительно включает этап очистки rVWF по меньшей мере от 50% rFVIII, присутствующего в отделенном супернатанте.

27. rVWF композиция по п.26, где отношение rVWF к rFVIII после очистки составляет по меньшей мере 10:1.

28. rVWF композиция по п.1, где способ дополнительно включает этап обогащения rVWF.

29. rVWF композиция по п.1, где композицию получают в форме для фармацевтического введения.

30. rVWF композиция по п.1, где указанную композицию получают в форме для внутривенного введения.

31. rVWF композиция, содержащая rVWF, имеющая удельную ристоцетин-кофакторную активность по меньшей мере 40 мЕ/мкг, где композиция получена способом, содержащим стадии:

(a) обеспечение основной среды для культивирования клеток;

(b) добавление в основную среду для культивирования клеток меди до конечной концентрации меди по меньшей мере 2,4 мкг/л;

(c) обеспечение одной или более клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую rVWF белок;

(d) культивирование одной или более клеток в культуральной среде, дополненной медью, в результате чего происходит экспрессия и секретирование rVWF клетками в культуральный супернатант, причем концентрацию NH_4^+ в супернатанте клеточной культуры поддерживают на уровне ниже 10 мМ; и

(e) отделение по меньшей мере части культурального супернатанта, где по меньшей мере 20% rVWF в композиции представлено высокомолекулярными мультимерами VWF, состоящими более чем из 10 димеров.

32. Супернатант клеточной культуры, содержащий рекомбинантный фактор фон Виллебранда (rVWF), где по меньшей мере 20% rVWF представлено высокомолекулярными мультимерами VWF, состоящими более чем из 10 димеров, где в супернатант клеточной культуры вводят медь для достижения конечной концентрации меди по меньшей мере 2,4 мкг/л и где концентрацию NH_4^+ в супернатанте клеточной культуры поддерживают на уровне ниже 10 мМ.

33. Супернатант клеточной культуры по п.32, где супернатант обладает по меньшей мере 0,5 МЕ ристоцетин-кофакторной активности на мл.

34. Супернатант клеточной культуры по п.32, где супернатант имеет удельную ристоцетин-кофакторную активность rVWF, составляющую по меньшей мере 30 мЕ/мкг rVWF.

35. Супернатант клеточной культуры по п.32, где супернатант имеет удельную ристоцетин-кофакторную активность rVWF, составляющую по меньшей мере 40 мЕ/мкг rVWF.

36. Супернатант клеточной культуры по п.32, где супернатант имеет удельную ристоцетин-кофакторную активность rVWF, составляющую по меньшей мере 50 мЕ/мкг rVWF.

37. Супернатант клеточной культуры по п.32, где супернатант имеет удельную ристоцетин-кофакторную активность rVWF, составляющую по меньшей мере 60 мЕ/мкг rVWF.

38. Супернатант клеточной культуры по п.32, где супернатант имеет удельную ристоцетин-кофакторную активность rVWF, составляющую по меньшей мере 70 мЕ/мкг rVWF.

39. Супернатант клеточной культуры по п.32, где супернатант имеет удельную ристоцетин-кофакторную активность rVWF, составляющую по меньшей мере 80 мЕ/мкг rVWF.

40. Супернатант клеточной культуры по п.32, где по меньшей мере 30% rVWF в супернатанте представлено высокомолекулярными мультимерами VWF, состоящими более чем из 10 димеров.

41. Супернатант клеточной культуры по п.32, где супернатант содержит высокомолекулярные мультимеры VWF, состоящие из от 14 до 22 димеров.

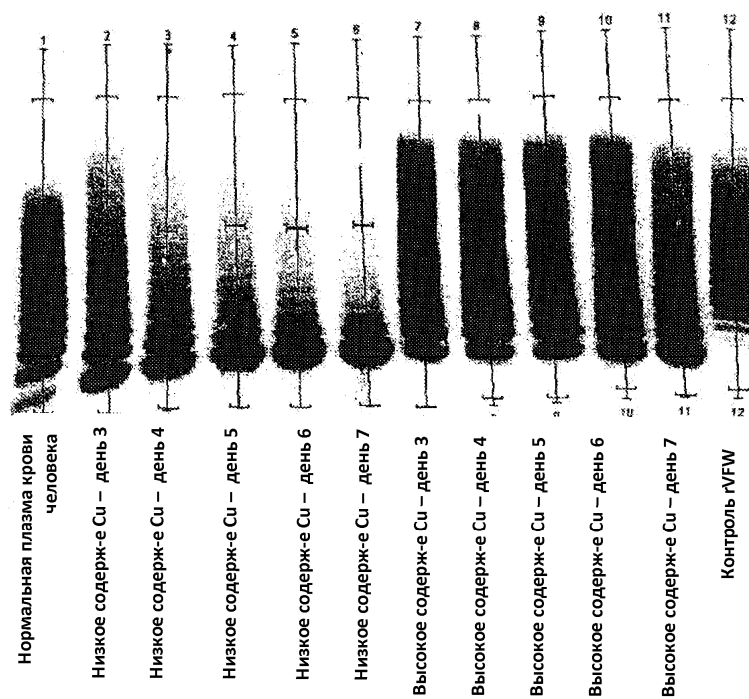
42. Супернатант клеточной культуры по п.32, где супернатант дополнительно содержит рекомбинантный фактор VIII (rFVIII).

43. Супернатант клеточной культуры по п.42, где отношение rVWF к rFVIII составляет по меньшей мере 10:1.

44. rVWF композиция по п.1, где концентрацию NH_4^+ в супернатанте клеточной культуры поддерживают на уровне ниже 4 мМ.

45. rVWF композиция по п.31, где концентрацию NH_4^+ в супернатанте клеточной культуры поддерживают на уровне ниже 4 мМ.

46. Супернатант клеточной культуры по п.32, где концентрацию NH_4^+ в супернатанте клеточной культуры поддерживают на уровне ниже 4 мМ.



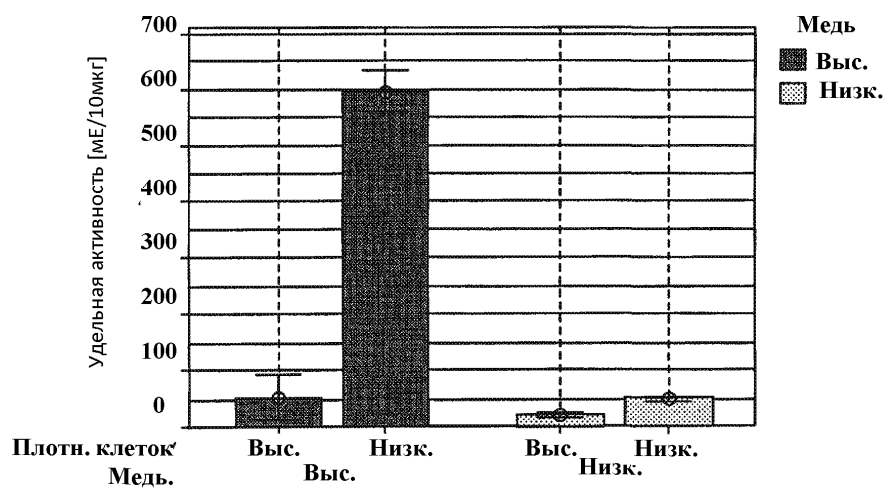
Фиг. 1А

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

Фиг. 1В

Интервальный график удельной активности [мЕ/10мкг]

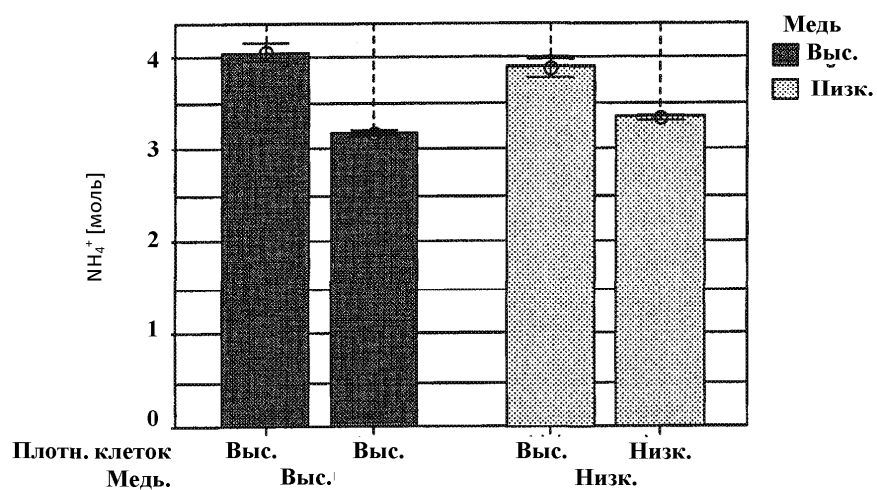
90% CL для среднего



Фиг. 2А

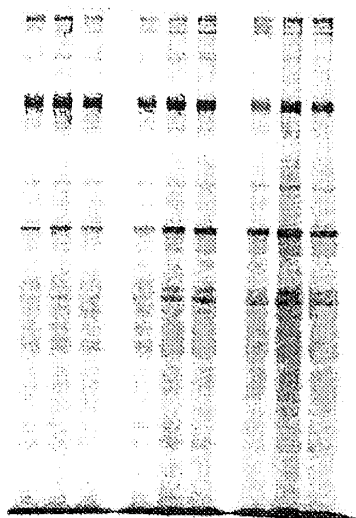
Интервальный график NH_4^+ [ммоль/г]

90% CL для среднего



Фиг. 2В

4 мкг/л 1 мкг/л 0,66 мкг/л



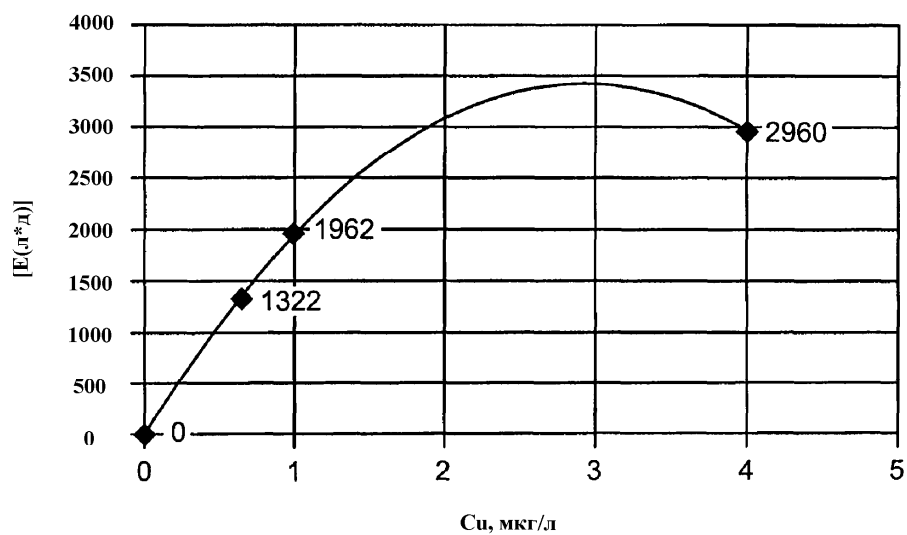
Фиг. 3А

4 мкг/л 1 мкг/л 0,66 мкг/л



Фиг. 3В

P Frets/Медь



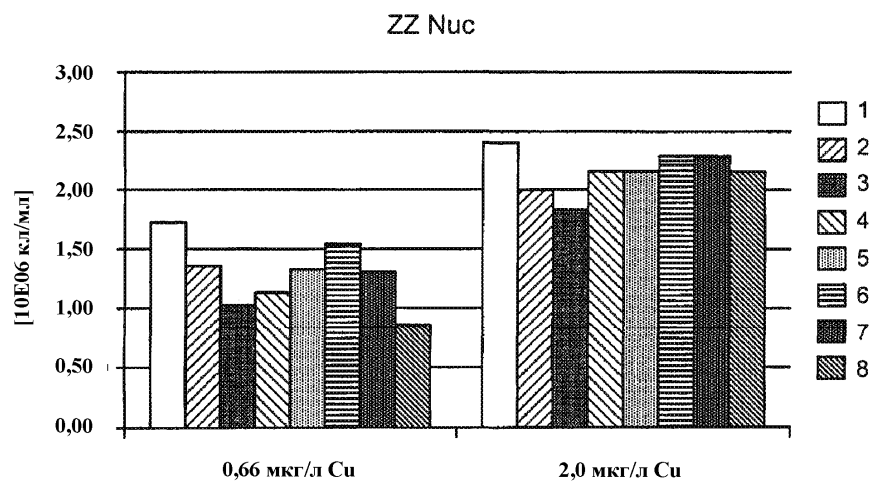
$$y = -400,37x^2 + 2344,5x - 11,267$$

$$R^2 = 0,9994$$

◆ среднее по 4-м неделям CST

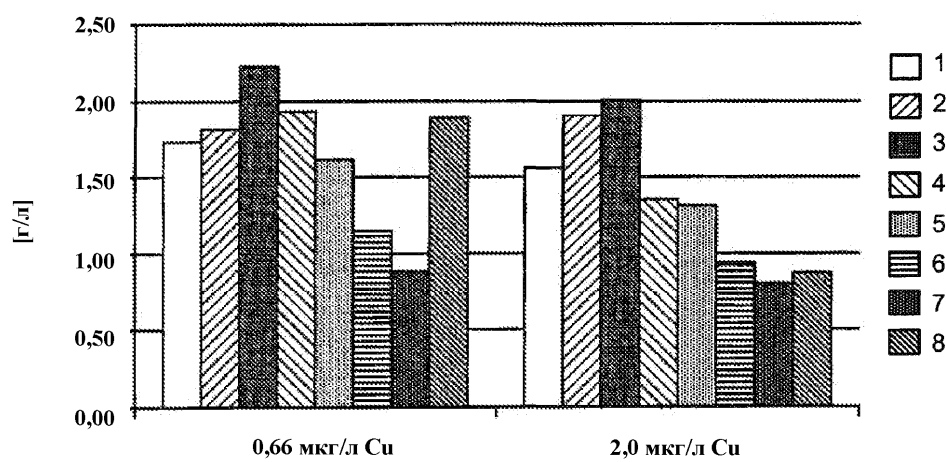
— Poly. (среднее по 4 нед. CST)

Фиг. 4

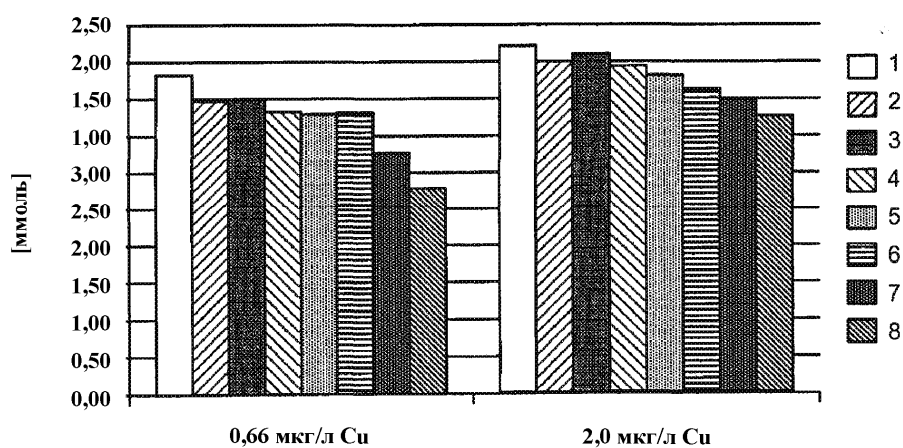


Фиг. 5А

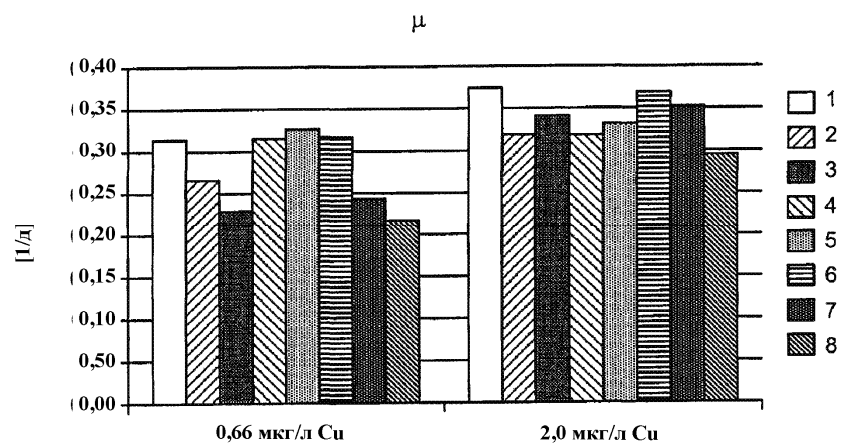
Остаточная глюкоза



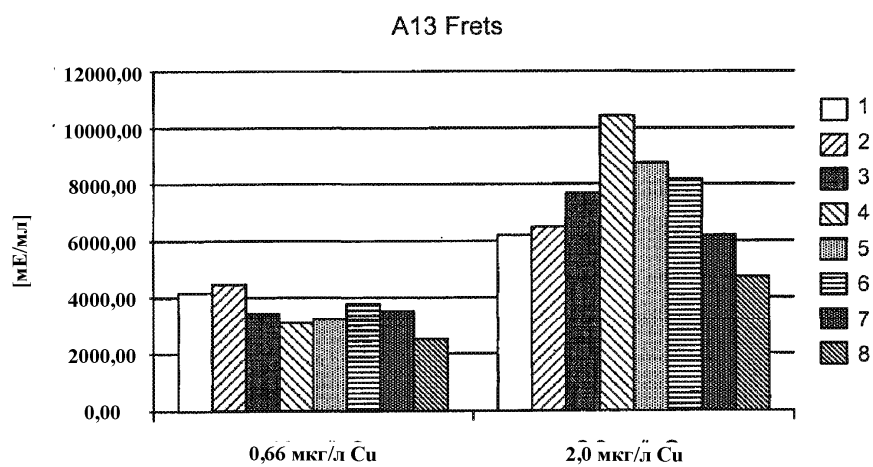
Фиг. 5В

NH₄⁺

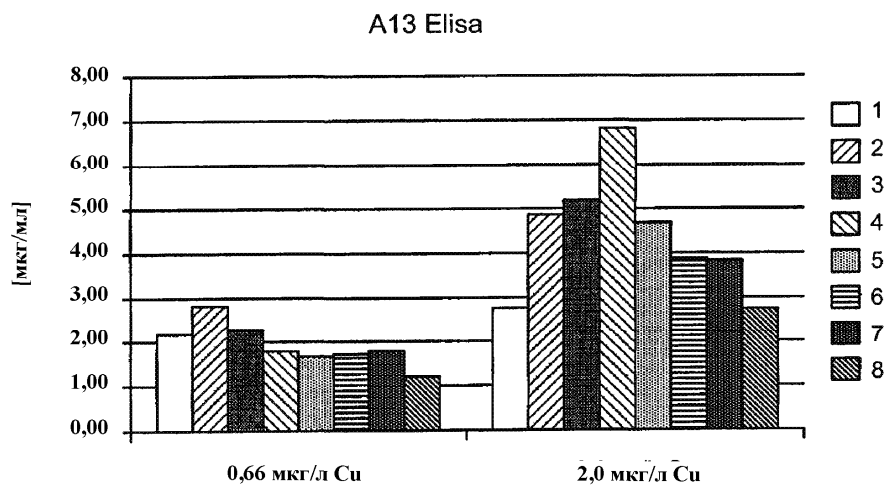
Фиг. 5С



Фиг. 5D

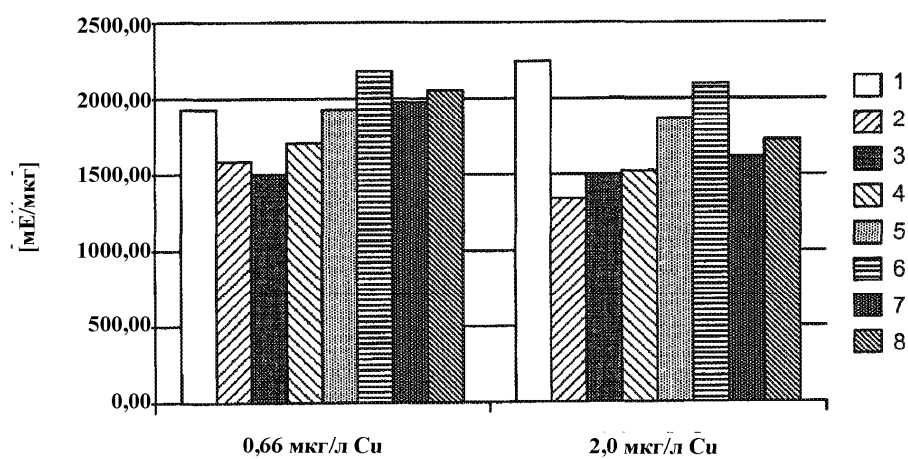


Фиг. 5E



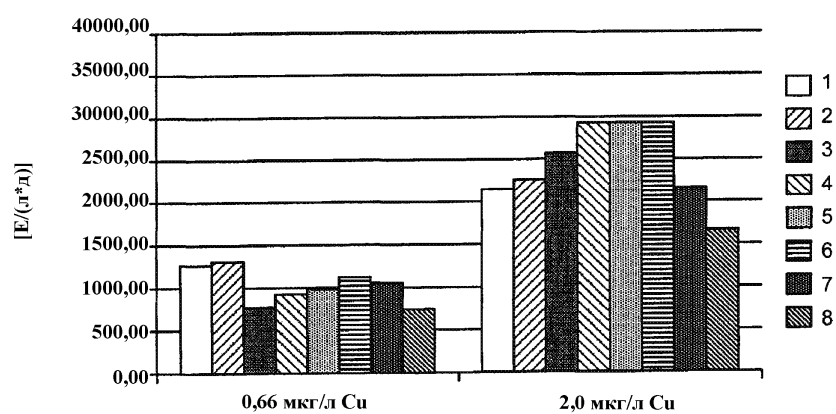
Фиг. 5F

Удельная активность



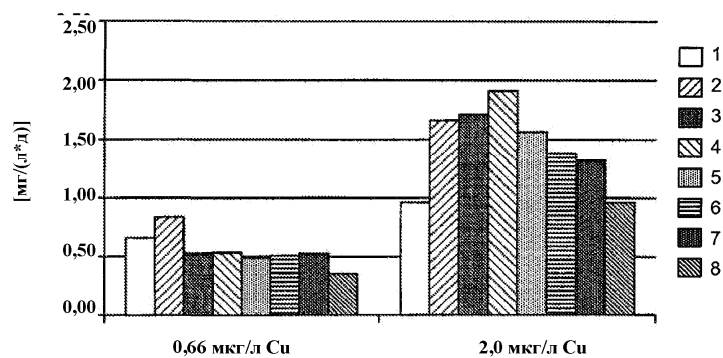
Фиг. 5G

P A13 FRETS



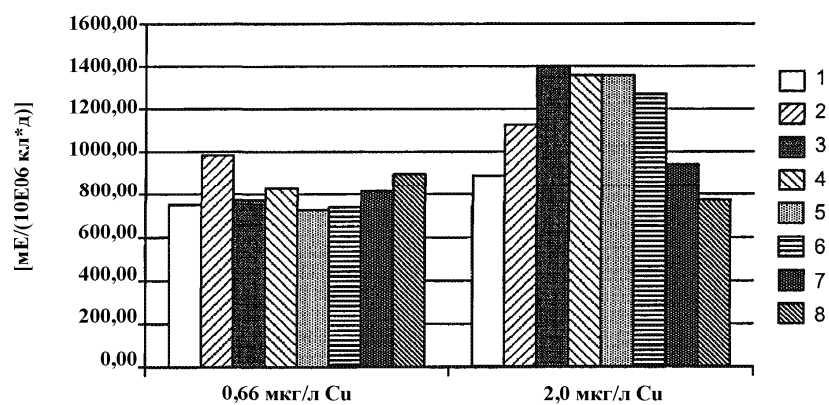
Фиг. 5H

P A13 Elisa



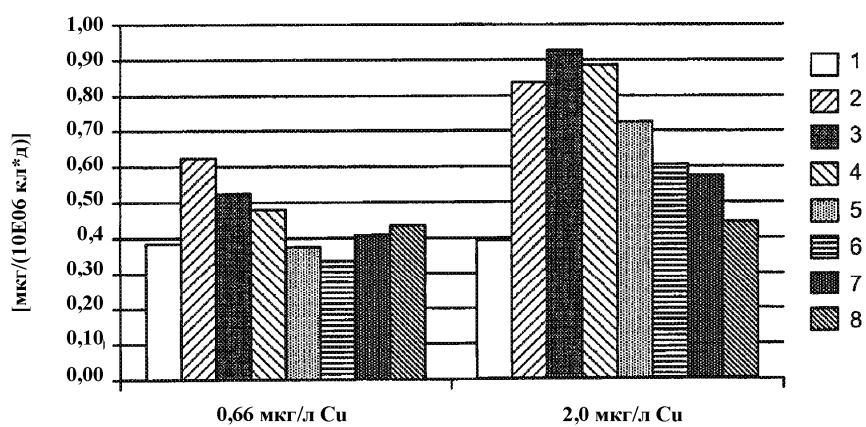
Фиг. 5I

q A13 FRETs

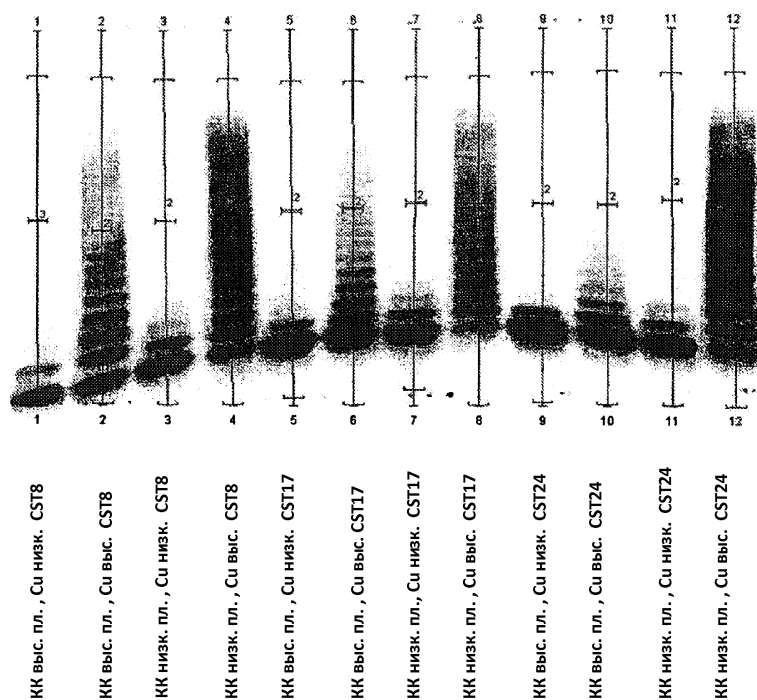


Фиг. 5J

q A13 ELISA



Фиг. 5K



Фиг. 6A

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



Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2