



**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2016.05.31**

**(51)** Int. Cl. *C12N 5/00* (2006.01)  
*C12N 9/64* (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201270224**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2010.07.30**

**(54) СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ ADAMTS**

**(31)** **61/230,477**

**(32)** **2009.07.31**

**(33)** **US**

**(43)** **2012.09.28**

**(86)** **PCT/US2010/044020**

**(87)** **WO 2011/014838 2011.02.03**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**БАКСТЕР ИНТЕРНЭШНЛ ИНК.  
(US); БАКСТЕР ХЕЛТКЭР С.А. (CH)**

**(72)** Изобретатель:  
**Грильбергер Леопольд, Шпенгер  
Александра, Хасслахер Майнхард,  
Грильбергер Рана, Райтер Манфред  
(AT)**

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

**(56)** PLAIMAUER B. ET AL.: "Cloning, expression, and functional characterization of the von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13)", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, LNKD-DOI:10.1182/BLOOD-2002-05-1397, vol. 100, no. 10, 15 November 2002 (2002-11-15), pages 3626-3632, XP002979372, ISSN: 0006-4971, cited in the application, page 3628, column 1, paragraph 4 - column 2, paragraph 1

BEVITT D.J. ET AL.: "Expression of ADAMTS metalloproteinases in the retinal pigment

epithelium derived cell line ARPE-19: transcriptional regulation by TNFalpha", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. GENE STRUCTURE AND EXPRESSION, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL LNKD-DOI:10.1016/S0167-4781(03)00047-2, vol. 1626, no. 1-3, 15 April 2003 (2003-04-15), pages 83-91, XP004420599, ISSN: 0167-4781, page 84, column 2, paragraph 1

WO-A2-0242441

DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 16 November 2002 (2002-11-16), SCHEIFLINGER FRIEDRICH ET AL.: "Recombinant Expression and Functional Characterization of the von Willebrand Factor-Cleaving Protease (ADAMTS13)." XP002599525, Database accession no. PREV200300356456, abstract & BLOOD, vol. 100, no. 11, 16 November 2002 (2002-11-16), page, Abstract No. 475, 44TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY; PHILADELPHIA, PA, USA; DECEMBER 06-10, 2002, ISSN: 0006-4971

"Technical Resources - Media Formulations D-MEM/F-12 (1X) liquid 1:1". [Online] 2010, XP002599526, Invitrogen by Life Technologies Retrieved from the Internet: URL:[http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/media\\_formulation.214.html](http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/media_formulation.214.html)> [retrieved on 2010-09-07]

**(57)** Изобретение относится к культуральным средам, которые применимы для экспрессии белков ADAMTS, таких как ADAMTS13. Также предлагаются способы экспрессии и очистки белков ADAMTS. В некоторых вариантах среды и способы согласно изобретению применимы для экспрессии белков ADAMTS, обладающих высокими удельными активностями. Также предлагаются композиции белков ADAMTS, например ADAMTS13, с высокими удельными активностями, которые экспрессированы и очищены согласно способам, предлагаемым в настоящем изобретении.

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет на основании предварительной заявки на выдачу патента США № 61/230477, поданной 31 июля 2009, которая специально включена в настоящее описание путем ссылки в полном объеме для всех целей.

Заявление о правах на изобретения, сделанные при исследовании или разработке, финансируемой из федерального бюджета, не применимо.

### Уровень техники

Белки ADAMTS (дезинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина типа I) представляют собой семейство металлопротеиназ, содержащих несколько консервативных доменов, включая цинкзависимый каталитический домен, богатый цистеином домен, подобный дезинтегрину домен и по меньшей мере один, а в большинстве случаев несколько повторов тромбоспондина типа I (обзор см. в публикации Nicholson et al., BMC Evol Biol. 2005 Feb 4; 5(1):11). Такие белки, которые эволюционно родственны семействам металлопротеиназ ADAM и MMP (Jones G.C., Curr Pharm Biotechnol. 2006 Feb; 7(1):25-31), являются секретируемыми ферментами, которые связаны с рядом заболеваний и состояний, включая тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП) (Moake J.L., Semin Hematol. 2004 Jan; 41(1):4-14), соединительнотканное заболевание, злокачественные опухоли, воспаление (Nicholson et al.) и тяжелую малярию, вызванную *Plasmodium falciparum* (Larkin et al., PLoS Pathog. 2009 Mar; 5(3):e1000349). В связи с указанной ассоциацией ферменты ADAMTS были признаны потенциальными терапевтическими мишенями для ряда патологий (Jones G.C., Curr Pharm Biotechnol. 2006 Feb; 7(1):25-31). Соответственно, существует необходимость в способах получения больших количеств белков ADAMTS, обладающих высокими удельными активностями, которые не содержат примесей, таких как вирусы, ГЭКРС (BSE) и патогены, подобные бактериям *Mycoplasma*.

Для культивирования клеток, особенно эукариотических клеток, и более конкретно, клеток млекопитающих, постоянно требуется использование специальных культуральных сред, обеспечивающих питательные вещества, которые необходимы для эффективного роста клеток и для продуцирования биологических продуктов, особенно биофармацевтических веществ, таких как, например, рекомбинантные белки, антитела, вирусы, вирусные антигены и вирусоподобные частицы. Для эффективного продуцирования указанных биологических продуктов важно достижение оптимальной плотности клеток, а также увеличение самой экспрессии белка, чтобы получить максимальный выход продукта.

В составы сред для культивирования клеток дополнительно вводили ряд добавок, включая неидентифицированные компоненты, подобные фетальной сыворотке теленка (FCS), несколько полученных от животных белков и/или гидролизатов бычьего белка, а также гидролизаты белков, полученных из растений или дрожжей.

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 полученные из них биологические продукты. Кроме того, полученные из сыворотки человека добавки необходимо тестировать в отношении всех известных вирусов, включая вирусы гепатита и ВИЧ, которые могут передаваться через сыворотку. Кроме того, бычья сыворотка и полученные из нее продукты несут риск заражения ГЭКРС. Кроме того, все полученные из сыворотки продукты могут быть загрязнены неизвестными веществами. При использовании в культуре клеток сыворотки или белковых добавок, полученных от человека или из животных источников, существуют многочисленные проблемы (например, варьирующий качественный состав разных партий и риск загрязнения микоплазмой, вирусами или ГЭКРС), особенно если клетки используют в производстве лекарственных средств или вакцин для введения человеку.

Поэтому было предпринято множество попыток получения эффективных систем хозяев и условий культивирования, которые не требуют использования сыворотки или других соединений животных белков.

Такие бессывороточные среды были разработаны на основе белковых экстрактов, полученных из растений или дрожжей. Например, известно, что соевые гидролизаты применимы для процессов ферментации и могут усиливать рост многих требовательных к среде организмов, дрожжей и грибов. В публикации WO 96/26266 описано, что продукты расщепления папаином соевой муки являются источником углеводов и азота, и многие компоненты можно использовать в культурах тканей. Franek et al. (Biotechnology Progress (2000) 16, 688-692) описали стимулирующие рост и продуктивность эффекты определенных пептидных фракций гидролизатов сои и пшеницы.

В WO 96/15231 описана бессывороточная среда, состоящая из синтетической минимальной необходимой среды и дрожжевого экстракта, для размножения клеток позвоночных и способа получения вирусов. Состав среды, состоящей из основной среды для культуры клеток, содержащей пептид риса и экстракт дрожжей и продукт его ферментативного расщепления, и/или липид растений, для роста клеток животных описан в WO 98/15614. Среда, содержащая очищенный соевый гидролизат, 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 присутствия рекомбинантных форм животных белков, таких как факторы роста.

В EP-A-0481791 описана биохимически определенная культуральная среда для культивирования сконструированных клеток СНО, которая не содержит белков, липидов и углеводов, выделенных из животного источника, дополнительно содержащая рекомбинантный инсулин или аналог инсулина, от 1 до 0,025% мас./об. расщепленного папаином соевого пептона 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 контексте настоящего описания следует отметить, что путресцин, как известно, также содержится в стандартных средах, подобных DMEM/среде Хама F12, в концентрации 0,08 мг/л.

Однако растительные и/или дрожжевые гидролизаты представляют собой неопределенные смеси олигопептидов и других неизвестных компонентов и примесей. Кроме того, качество коммерчески доступных партий гидролизатов сильно варьирует. В результате имеет место широкое варьирование при получении рекомбинантных белков или вирусных продуктов (до трехкратного варьирования) в зависимости от партий используемых гидролизатов ("варьирование от партии к партии"). Такой недостаток сказывается на пролиферации клеток, а также экспрессии белка в каждой клетке. В публикации US 2007/0212770 описаны различные не содержащие животных белков и не содержащие животных олигопептидов, химически определенные культуральные среды, которые применимы для получения биофармацевтических препаратов рекомбинантных белков в большом масштабе.

Один из представителей семейства ADAMTS, ADAMTS13, расщепляет фактор фон Виллебранда (vWF) между остатками Tyr1605 и Met 1606, и такая функция ответственна за распад крупных мультимеров vWF *in vivo*. Утрата активности ADAMTS13 связывали с рядом состояний, таких как ТТР (Moake J.L., *Semin Hematol.* 2004 Jan; 41(1):4-14), острое и хроническое воспаление (Chauhan et al., *J Exp Med.* 2008 Sep 1; 205(9):2065-74), и совсем недавно с тяжелой малярий, вызываемой *Plasmodium falciparum* (Larkin et al., *PLoS Pathog.* 2009 Mar; 5(3):e1000349).

Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТР) представляет собой расстройство, характеризующееся тромботической микроангиопатией, тромбоцитопенией и тромбозом микрососудов, который может вызывать различные степени ишемии тканей и инфаркта. Клинически пациентов с ТТР диагностируют по симптомам, таким как тромбоцитопения, шизоциты (фрагменты эритроцитов) и повышенные уровни лактатдегидрогеназы (Moake J.L. *Thrombotic microangiopathies.* *N Engl J Med.* 2002; 347:589-600; Moake J.L. *von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura.* *Semin Hematol.* 2004; 41:4-14; Sadler J.E., Moake J.L., Miyata T., George J.N. *Recent advances in thrombotic thrombocytopenic purpura.* *Hematology (Am Soc. Hematol Educ Program).* 2004:407-423; Sadler J.E. *New concepts in von Willebrand disease.* *Annu Rev Med.* 2005; 56:173-191).

В 1982 г. Моак с соавторами обнаружили необычно крупные мультимеры фактора фон Виллебранда (UL-vWF) в плазме пациентов с хронической рецидивирующей ТТР (Moake J.L., Rudy C.K., Troll J.H., Weinstein M.J., Colannino N.M., Azocar J., Seder R.H., Hong S.L., Deykin D. *Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura.* *N Engl J Med.* 1982; 307:1432-1435). Связь между UL-vWF и ТТР была подтверждена независимыми данными, полученными Furlan с соавторами и Tsai и Lian, о том, что большинство пациентов, страдающих от ТТР, имеют недостаточное количество в плазме металлопротеазы, в настоящее время известной как ADAMTS13, которая расщепляет vWF (Furlan M., Robles R., Solenthaler M., Wassmer M., Sandoz P., Laemmle B. *Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura.* *Blood.* 1997; 89:3097-3103; Tsai H.M., Sussman I.I., Ginsburg D., Lankhof H., Sixma J.J., Nagel R.L. *Proteolytic cleavage of recombinant type 2A von Willebrand factor mutants R834W and R834Q: inhibition by doxycycline and by monoclonal antibody VP-1.* *Blood.* 1997; 89:1954-1962; Tsai H.M., Lian E.C. *Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura.* *N Engl J Med.* 1998; 339:1585-1594).

Протеаза ADAMTS13 является гликозилированным белком с молекулярной массой 190 кД, продуцируемым, главным образом, в печени (Levy G.G., Nichols W.C., Lian E.C., Foroud T., McClintick J.N., McGee B.M., Yang A.Y., Siemieniak D.R., Stark K.R., Gruppo R., Sarode R., Shurin S.B., Chandrasekaran V., Stabler S.P., Sabio H., Bouhassira E.E., Upshaw J.D., Jr., Ginsburg D., Tsai H.M. *Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura.* *Nature.* 2001; 413:488-494; Fujikawa K., Suzuki H., McMullen B., Chung D. *Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family.* *Blood.* 2001; 98:1662-1666; Zheng X., Chung D., Takayama T.K., Majeras E.M., Sadler J.E., Fujikawa K. *Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura.* *J Biol. Chem.* 2001; 276:41059-41063; Soejima K., Mimura N., Hirashima M., Maeda H., Hamamoto T., Nakagaki T., Nozaki C. *A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood: possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease;* *J Biochem (Tokyo).* 2001; 130:475-480; Gerritsen H.E., Robles R., Lammle B., Furlan M. *Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor-cleaving protease.* *Blood.* 2001; 98:1654-1661).

Показано, что мутации в гене ADAMTS13 вызывают ТТР (Levy G.G., Nichols W.C., Lian E.C.,

Foroud T., McClintick J.N., McGee B.M., Yang A.Y., Siemieniak D.R., Stark K.R., Gruppo R., Sarode R., Shurin S.B., Chandrasekaran V., Stabler S.P., Sabio H., Bouhassira E.E., Upshaw J.D., Jr., Ginsburg D., Tsai H.M. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*. 2001; 413:488-494). Идиопатическая ТТР, часто вызываемая аутоантителами, ингибирующими активность ADAMTS-13, является более распространенным расстройством, которое встречается у взрослых и детей старшего возраста и может рецидивировать с регулярными интервалами у 11-36% пациентов (Tsai H.M., Lian E.C. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*. 1998; 339:1585-1594; Furlan M., Lammle B. Deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease in familial and acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Baillieres Clin Haematol*. 1998; 11:509-514).

Не нейтрализующие аутоантитела также могут ингибировать активность ADAMTS13 благодаря индукции выведения из циркуляции (Scheiflinger F., Knobl P., Trattner B., Plaimauer B., Mohr G., Dockal M., Dorner F., Rieger M. Nonneutralizing IgM and IgG antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2003; 102:3241-3243). Активность ADAMTS13 в плазме у здоровых взрослых людей колеблется в диапазоне от 50 до 178% (Moake J.L. Thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic uremic syndrome. *Arch Pathol Lab Med*. 2002; 126:1430-1433). У большинства пациентов с наследственной или приобретенной ТТР активность ADAMTS13 в плазме отсутствует или составляет менее 5% от нормальной активности. Без лечения уровень смертности в случае ТТР превышает 90%, но плазмотерапия снижала смертность приблизительно до 20% (Moake J.L. Thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic uremic syndrome. *Arch Pathol Lab Med*. 2002; 126:1430-1433).

vWF, синтезированный в мегакариоцитах и эндотелиальных клетках, хранится в  $\alpha$ -гранулах тромбоцитов и тельцах Вейбеля-Палада, соответственно, в виде сверхкрупных vWF (UL-vWF) (Moake J.L., Rudy C.K., Troll J.H., Weinstein M.J., Colannino N.M., Azocar J., Seder R.H., Hong S.L., Deykin D. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*. 1982; 307:1432-1435; Wagner D.D., Olmsted J.B., Marder V.J. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol*. 1982; 95:355-360; Wagner D.D., Bonfanti R. von Willebrand factor and the endothelium. *Mayo Clin Proc*. 1991; 66:621-627; Sporn L.A., Marder V.J., Wagner D.D. von Willebrand factor released from Weibel-Palade bodies binds more avidly to extracellular matrix than that secreted constitutively. *Blood*. 1987; 69:1531-1534; Tsai H.M., Nagel R.L., Hatcher V.B., Sussman, I.I. Endothelial cell-derived high molecular weight von Willebrand factor is converted into the plasma multimer pattern by granulocyte proteases. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989; 158:980-985; Tsai H.M., Nagel R.L., Hatcher V.B., Sussman I.I. Multimeric composition of endothelial cell-derived von Willebrand factor. *Blood*. 1989; 73:2074-2076). После секреции из эндотелиальных клеток такие мультимеры UL-vWF расщепляются в кровообращении под действием ADAMTS13 на серию более мелких мультимеров в конкретных участках расщепления в молекуле vWF (Tsai H.M., Nagel R.L., Hatcher V.B., Sussman I.I. Endothelial cell-derived high molecular weight von Willebrand factor is converted into the plasma multimer pattern by granulocyte proteases. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989; 158:980-985; Dent J.A., Galbusera M., Ruggeri Z.M. Heterogeneity of plasma von Willebrand factor multimers resulting from proteolysis of the constituent subunit. *J Clin Invest*. 1991; 88:774-782; Furlan M., Robles R., Affolter D., Meyer D., Baillod P., Lammle B. Triplet structure of von Willebrand factor reflects proteolytic degradation of high molecular weight multimers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:7503-7507).

ADAMTS13 расщепляет связь Tyr842-Met843 в центральном домене A2 зрелой субъединицы vWF и требует присутствия цинка или кальция для своей активности (Dent J.A., Berkowitz S.D., Ware J., Kasper C.K., Ruggeri Z.M. Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87:6306-6310). vWF существует в форме "клубка пряжи" и нитчатой форме, как видно под электронным микроскопом (Slayter H., Loscalzo J., Bockenstedt P., Handin R.I. Native conformation of human von Willebrand protein. Analysis by electron microscopy and quasi-elastic light scattering. *J Biol Chem*. 1985; 260:8559-8563). Кроме того, атомно-силовая микроскопия подтверждает, что vWF существует в глобулярной конформации в статических условиях и в подвергнутом фолдингу нитчатом состоянии после воздействия сдвигового напряжения (Siedlecki C.A., Lestini B.J., Kottke-Marchant K.K., Eppell S.J., Wilson D. L., Marchant R.E. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood*. 1996; 88:2939-2950). Такое явление может иметь место также *in vivo*, когда один конец филамента vWF заякорен на поверхности.

Тромбы у пациентов с ТТР состоят из небольшого количества фибрина и, главным образом, из vWF и тромбоцитов, свидетельствуя о том, что причиной тромбоза является опосредованная vWF агрегация тромбоцитов (Asada Y., Sumiyoshi A., Hayashi T., Suzumiya J., Kaketani K. Immunohistochemistry of vascular lesion in thrombotic thrombocytopenic purpura, with special reference to factor VIII related antigen. *Thromb Res*. 1985; 38:469-479). Пациенты с рецидивирующей ТТР имеют сверхкрупные мультимеры в плазме. Мультимеры UL-vWF накапливаются с течением времени, так как длительное присутствие ингибитора (анти-АОАМТ313-Ат) снижает активность ADAMTS13. Мультимеры UL-vWF являются гиперактивными и разворачиваются в результате сдвигового напряжения, вызывая агрегацию тромбоцитов, приводя-

щую к внутрисосудистому тромбозу (Tsai H M. Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Mol Med.* 2002; 80:639-647; Tsai H.M. Deficiency of ADAMTS-13 in thrombotic and thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost.* 2003; 1:2038-2040; discussion 2040-2035).

Предполагается, что присутствие гиперреактивных мультимеров UL-vWF в плазме из-за недостаточности ADAMTS13 может быть ассоциировано с повышенным риском артериального тромбоза, связанного с коронарной болезнью сердца.

Так как белки ADAMTS вовлечены в ряд заболеваний и состояний, в данной области существует необходимость способов крупномасштабного получения рекомбинантных белков ADAMTS, обладающих высокой удельной активностью, которые подходят для приготовления и введения фармацевтических препаратов. Настоящее изобретение относится к способам, которые удовлетворяют указанные и другие потребности в данной области для получения и очистки белков ADAMTS.

#### **Сущность изобретения**

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам экспрессии белков дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина (ADAMTS). В некоторых вариантах способы, предлагаемые в изобретении, преимущественно приводят к повышенным уровням экспрессии и к получению белков ADAMTS со значимо повышенными активностями. Такие улучшенные свойства в одном примере могут быть достигнуты благодаря добавлению в культуральную среду, применяемую для экспрессии белков ADAMTS, повышенных уровней различных компонентов, таких как кальций, цинк или никотинамид (витамин B3). В предпочтительном варианте белком ADAMTS является белок ADAMTS13.

В другом аспекте изобретение относится к способам увеличения экспрессии и/или уровней активности белка ADAMTS посредством культивирования рекомбинантных клеток, несущих нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS, в не содержащих животных белков и химически определенных средах в условиях периодической культуры, культуры с подпиткой или непрерывной культуры клеток. В некоторых вариантах такие способы включают применение периодического культивирования, культивирования с подпиткой, проточного культивирования или культивирования клеток в хемостате, причем культивирование может быть осуществлено либо в виде суспензии клеток, либо в виде прикрепленных клеток. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является белок ADAMTS13.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам уменьшения степени утраты активности во время очистки белка ADAMTS. В некоторых вариантах способы включают добавление в буферы для очистки дополнительных уровней кальция и/или цинка. В конкретном варианте способы относятся к стабилизации активности белка ADAMTS во время стадии ультрафильтрации и/или диафильтрации, используемых в ходе очистки. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является белок ADAMTS13.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способам получения белка ADAMTS с повышенной активностью для применения при получении фармацевтической композиции. В некоторых вариантах такие способы включают применение не содержащих животных белков и/или химически определенных культуральных сред в условиях, подходящих для повышенной экспрессии белка ADAMTS, обладающего повышенной активностью. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является белок ADAMTS13.

В родственном аспекте настоящее изобретение относится к не содержащим животных белков, не содержащим олигопептидов и химически определенным средам, которые применимы для экспрессии белков ADAMTS, обладающих высокой удельной активностью. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является белок ADAMTS13.

#### **Краткое описание чертежей**

Фиг. 1. Объемная FRETС-VWF73-продуктивность рекомбинантного ADAMTS13 человека, экспрессированного в клетках CHO, культивируемых в не содержащей животных белков среде в различных условиях температуры и pH. Результаты различных экспериментов по культивированию клеток показаны в виде (А) изображения в изолиниях и (В) графика поверхности, представляющих нормализованную объемную FRETС-VWF73-продуктивность ADAMTS13 в виде функции температуры и pH культуры.

Фиг. 2. Уровни удельной активности (FRETС-VWF73/антиген по данным ELISA) клеток CHO, экспрессирующих рекомбинантный ADAMTS13 человека, культивируемых в не содержащей животных белков среде в различных условиях температуры и pH. Результаты различных экспериментов по культивированию клеток показаны в виде (А) изображения в изолиниях и (В) графика поверхности, представляющих удельную активность в виде функции температуры и pH культуры.

#### **Подробное описание изобретения**

##### **I. Введение**

Белки ADAMTS (т.е. ADAMTS-1-ADAMTS-20) представляют собой семейство секретируемых цинковых металлопротеиназ, которые имеют общую модульную организацию доменов (см. обзор Flanagan C.R., *Front Biosci.* 2006 Jan 1; 11:544-69). Все белки ADAMTS имеют общую структуру коровых доменов, состоящих из сигнального пептида, за которым следует продомен, цинкзависимый металлопротеиназный каталитический домен, подобный дезинтегрину домен, повтор тромбоспондина типа I, богатый цистеином домен и спейсерный домен (Arpe S.S., *J Biol Chem.* 2009 Nov 13; 284 (46) :31493-7). Кроме

того, все они, кроме ADAMTS-4, содержат по меньшей мере еще один повторяющийся домен тромбоспондина типа I, и многие из белков ADAMTS содержат один или несколько дополнительных вспомогательных доменов. Причем сообщалось, что все белки ADAMTS, по-видимому, содержат по меньшей мере один участок связывания кальция и по меньшей мере один участок связывания цинка, локализованные в каталитическом домене металлопротеиназы (Andreini et al., J. Proteome Res., 2005, 4(3), pp 881-888).

Сообщалось о биологической роли белков ADAMTS в случае различных заболеваний и состояний, включая ангиогенез, интерстициальный фиброз почек, ремоделирование кости, фолликулогенез яичников, атеросклероз, развитие мочеполовой системы и рост опухолей/ремоделирование (ADAMTS-1); синдром Элерса-Данлоса типа 7C и дерматоспараксис крупного рогатого скота (ADAMTS-2); артрит, атеросклероз и тендинопатию (ADAMTS-4); артрит и глиобластому (ADAMTS-5); артрит (ADAMTS-7); ангиогенез, злокачественное новообразование головного мозга, артрит и атеросклероз (ADAMTS-8); артрит (ADAMTS-9, 12); тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ADAMTS-13); и антитромбоз/инсульт (ADAMTS 18) (обзор см. в публикации Lin and Liu, Open Access Rheumatology Research and Reviews 2009:1 121-131).

Рекомбинантный ADAMTS13 (A13) ранее экспрессировали в клетках млекопитающих, однако удельная активность широко варьировала в зависимости от условий культивирования. Было обнаружено, что многие коммерчески доступные культуральные среды недостаточны для экспрессии A13 с высокими удельными активностями, выраженными в виде отношения активности, измеряемой в анализе FRETС-VWF73, к содержанию антигена, которое определяют методом ELISA. В одном аспекте способы, предлагаемые в настоящем изобретении, основаны на нескольких полезных данных, которые позволяют осуществлять в культуре клеток экспрессию A13, обладающего повышенными уровнями общей и удельной активности.

Исследования, описанные в настоящей публикации, показывают, что некоторая минимальная концентрация кальция в культуральной среде, приблизительно от 0,5 мМ до приблизительно 1,5 мМ, требуется для экспрессии активного A13. Кроме того, было обнаружено, что при добавлении в культуральную среду повышенных уровней цинка полученный экспрессированный белок A13 обладал более высокой общей и удельной активностью. Например, в культурах с добавлением дополнительного количества цинка в концентрации в 2-3 раза выше нормальной концентрации, по сравнению с концентрациями в стандартных химически определенных средах, таких как основанные на DMEM/F12 среды, удельная активность A13 была значимо повышена. Кроме того, дополнительное увеличение удельной активности A13 может быть достигнуто за счет увеличения концентрации никотинамида (витамина B3) приблизительно от 2 мг/л, как в стандартных основанных на DMEM/F12 средах, до приблизительно 7 мг/л. При культивировании рекомбинантных клеток CHO или HEK293 в средах с добавлением дополнительного кальция, цинка и/или никотинамида, могут быть получены удельные активности, составляющие по меньшей мере приблизительно от 500 миллиединиц/мкг, 1000 миллиединиц/мкг до приблизительно 2000 миллиединиц/мкг рекомбинантного A13 человека в крупномасштабных экспрессирующих культурах. Ранее не сообщалось о таких уровнях удельной активности рекомбинантно полученных белков A13. Преимущественно такие повышенные уровни активности A13 были достигнуты в химически определенной среде, не содержащей полученных от животных компонентов, обеспечивающей возможность стабильной и воспроизводимой экспрессии белков ADAMTS в крупном масштабе, подходящем для получения белков для производства фармацевтических препаратов. Кроме того, такие среды не содержат даже рекомбинантных белков, например инсулина, что приводит к получению продуктов, которые можно более безопасно использовать в препаратах для фармацевтического введения.

Настоящее изобретение также относится к способам, которые предотвращают потерю активности и удельной активности во время стандартной ультра/диафильтрации и других стадий очистки.

Предпочтительно было обнаружено, что при добавлении в буфер, используемый для диафильтрации, дополнительного количества кальция и цинка можно достичь значимого снижения потери активности A13, измеряемой в анализе FRETС-VWF73.

Соответственно, вследствие общей взаимосвязи структуры-функции между представителями семейства ADAMTS секретируемых металлопротеиназ, способы, предлагаемые в настоящем изобретении, обеспечивают экспрессию всех белков ADAMTS в культуре клеток и извлечение из культуральной среды.

## II. Определения

В используемом в настоящем описании смысле термины "витамин B3", "никотинамид", "ниацинамид", "ниацин" и "никотиновая кислота" могут быть использованы взаимозаменяемо по отношению к любому представителю семейства витаминов B3. Соответственно, любой представитель данного семейства может быть использован для дополнения среды, применяемой в способах согласно настоящему изобретению.

В используемом в настоящем описании смысле "белок ADAMTS" относится к полипептиду дезинтегрина и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина типа I из семейства металлопротеиназ. Представители данного 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 как полноразмерные белки, так и частичные полипептиды, которые проявляют, по меньшей мере, частичную биологическую активность, например по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более активности, проявляемой полноразмерным белком, в частности протеазной активности, проявляемой полноразмерным белком. В некоторых случаях белок ADAMTS будет модифицирован посттрансляционно либо *in vivo*, либо *in vitro*, например, ферментативными или химическими способами. Понятно, что белки ADAMTS согласно настоящему изобретению включают альтернативно сплайсируемые изоформы, консервативно модифицированные белки, по существу, идентичные белки, гомологи и тому подобное.

В контексте настоящего изобретения белок ADAMTS включает любого представителя семейства ADAMTS, например млекопитающего, такого как примат, человек, обезьяна, кролик, свинья, грызун, мышь, крыса, хомячок, песчанка, собака, кошка, и его биологически активные производные. Также включены мутантные белки ADAMTS и варианты белков ADAMTS, обладающие активностью, так же как функциональные фрагменты и слитые белки белков ADAMTS. Кроме того, белки ADAMTS согласно изобретению могут дополнительно содержать метки, которые облегчают очистку, регистрацию или и то и другое. Белки ADAMTS, описанные в настоящей публикации, могут быть дополнительно модифицированы терапевтическим остатком или остатком, подходящим для визуализации *in vitro* или *in vivo*.

В используемом в настоящем описании смысле термин "белок ADAMTS13" относится к любому белку или полипептиду с активностью ADAMTS13, в частности, способностью расщеплять пептидную связь между остатками Туг-842 и Met-843 VWF. В иллюстративном варианте белок ADAMTS13 относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность, которая в высокой степени сходна с аминокислотной последовательностью NP\_620594 (ADAMTS13, изоформа 1, препробелок) или аминокислотами 75-1427 NP\_620594 (ADAMTS13, изоформа 1, зрелый полипептид). В другом варианте белок ADAMTS13 относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность, которая в высокой степени сходна с аминокислотной последовательностью NP\_620596 (ADAMTS13, изоформа 2, препробелок) или аминокислотами 75-1371 NP\_620594 (ADAMTS13, изоформа 2, зрелый полипептид). В еще одном варианте белки ADAMTS13 включают полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, в высокой степени сходную с аминокислотной последовательностью NP\_620595 (ADAMTS13, изоформа 3, препробелок) или аминокислотами 75-1340 NP\_620595 (ADAMTS13, изоформа 1, зрелый полипептид). В используемом в настоящем описании смысле белок ADAMTS13 включает природные варианты с расщепляющей vWF активностью и искусственные конструкции с расщепляющей vWF активностью. В используемом в настоящем изобретении смысле ADAMTS13 охватывает любые природные варианты, альтернативные последовательности, изоформы или мутантные белки, которые сохраняют некоторую базальную активность. Примеры мутаций ADAMTS13, встречающихся в популяции человека, включают, без ограничения, 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, многие из которых, как было обнаружено, ассоциированы с тромботической тромбоцитопенической пурпурой (ТТП). Белки ADAMTS13 также включают полипептиды, содержащие посттрансляционные модификации. Например, было показано, что ADAMTS13 модифицирован N-ацетилглюкозамином (GlcNAc) по остаткам 614, 667 и 1354, и было высказано предположение, что остатки 142, 146, 552, 579, 707, 828 и 1235 также могут быть модифицированы таким образом.

Протеолитически активный рекомбинантный ADAMTS13 может быть получен при экспрессии в культурах клеток млекопитающих, как описано в публикации Plaimauer с соавторами (2002, Blood. 15; 100(10):3626-32) и в US 2005/0266528, описание которых включено в настоящее описание путем ссылки в полном объеме для всех целей. Способы получения рекомбинантной культуры экспрессирующих ADAMTS13 клеток описаны в публикации Plaimauer B., Scheiflinger F. (Semin Hematol. 2004 Jan; 41(1):24-33), содержание которой включено в настоящее описание путем ссылки в полном объеме для всех целей.

В используемом в настоящем описании смысле "одну единицу активности ADAMTS" определяют как количество активности в 1 мл объединенной нормальной плазмы человека, независимо от используемого анализа. Например, когда белком ADAMTS является ADAMTS13, одной единицей FRETС-VWF73-активности белка ADAMTS13 является количество активности, необходимой для расщепления такого же количества субстрата FRETС-VWF73 (Kokame et al., Br J Haematol. 2005 Apr; 129(1):93-100), которое расщепляется одним миллилитром объединенной нормальной плазмы человека. В соответствующем случае, активность ADAMTS13 может быть определена в функциональных анализах, таких как функциональные анализы с использованием модифицированных пептидов факторов фон Виллебранда в качестве субстрата для ADAMTS13 (Tripodi et al. J Thromb Haemost. 2008 Sep.; 6(9):1534-41). Предпочти-

тельный способ определения активности рекомбинантного ADAMTS13 человека описан Gerritsen с соавторами (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). *Thromb Haemost* 1999; 82:1386-1389). В одном варианте, чтобы считаться белком ADAMTS13, который определен выше, полипептид или белок должен обладать активностью в расщеплении vWF, составляющей по меньшей мере 1% активности нативного ADAMTS13. В других вариантах белок ADAMTS13 будет обладать активностью, составляющей по меньшей мере 10% активности нативного ADAMTS13. В следующих вариантах белок ADAMTS13 будет обладать активностью, составляющей 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 путем измерения антигена ADAMTS13, например, с использованием способа ELISA, описанного Rieger с соавторами (2006, *Thromb Haemost*. 2006 95(2):212-20).

В используемом в настоящем описании смысле "мкг ADAMTS13" или "мкг антигена ADAMTS13" означает количество ADAMTS13, которое обеспечивает такой же уровень регистрируемого белка в анализе ELISA, как и 1 мл объединенной нормальной плазмы человека. Такое определение основано на опубликованных оценках, свидетельствующих о том, что 1 мг ADAMTS13 присутствует в 1 мл нормальной плазмы человека и, следовательно, является приблизительным измерением.

В используемом в настоящем описании смысле термин "биологически активное производное" при использовании в контексте белка ADAMTS также охватывает полипептиды, полученные с использованием методики рекомбинантной ДНК. Такая методика может включать любой способ, известный в данной области для (i) получения рекомбинантной ДНК посредством генетической инженерии, например, благодаря обратной транскрипции РНК и/или амплификации ДНК, (ii) введения рекомбинантной ДНК в прокариотические или эукариотические клетки с использованием трансфекции, т.е. посредством электропорации или микроинъекции, (iii) культивирования указанных трансформированных клеток, например, непрерывным или периодическим образом, (iv) экспрессии белка ADAMTS, например, конститутивно или после индукции, и (v) выделения указанного белка ADAMTS, например, из культуральной среды или сбором трансформированных клеток, чтобы (vi) получить, по существу, очищенный рекомбинантный белок ADAMTS, например, с использованием ионообменной хроматографии, эксклюзионной хроматографии по размеру, аффинной хроматографии, хроматографии на основе гидрофобного взаимодействия и тому подобное. Термин "биологически активное производное" также включает химерные молекулы, такие как, например, белок ADAMTS или его функциональный фрагмент, в сочетании со вторым полипептидом, например доменом иммуноглобулина Fc или доменом альбумина, чтобы улучшить биологические/фармацевтические свойства, такие как, например, время полужизни белка ADAMTS в системе кровообращения млекопитающего, в частности человека.

В используемом в настоящем описании смысле термин "ультрафильтрация" охватывает множество способов мембранной фильтрации, в которых гидростатическое давление продавлиывает жидкость, преодолевая сопротивление полупроницаемой мембраны. Суспендированные твердые вещества и растворенные вещества с высокой молекулярной массой задерживаются, тогда как вода и растворенные вещества с низкой молекулярной массой проходят через мембрану. Указанный процесс разделения часто используют для очистки и концентрирования растворов макромолекул ( $10^3$ - $10^6$  Да), особенно растворов белков. Имеется несколько мембран для ультрафильтрации в зависимости от размера молекул, которые они задерживают. Ультрафильтрация обычно характеризуется использованием мембран с размером пор от 2 нм до 0,05 мкм и рабочего давления от 1 до 10 бар (0,1-1 МПа), и она особенно применима для отделения коллоидов, подобных белкам, от небольших молекул, подобных сахарам и солям. Напротив, нанофильтрация является другим управляемым давлением способом фильтрации, обычно характеризуемым использованием мембраны с размером пор от 0,5 до 2 нм и рабочего давления от 5 до 40 бар (0,5-4 МПа). Нанофильтрацию часто используют для осуществления разделения сахаров, других органических молекул и поливалентных солей, с одной стороны, и одновалентных солей и воды, с другой. В общем, ультрафильтрацию можно осуществлять в режиме "тупиковой" фильтрации или в режиме тангенциально-проточной фильтрации (TFF).

В используемом в настоящем описании смысле термин "диафильтрация" относится к другому способу мембранной фильтрации, иногда называемому тангенциально-проточной фильтрацией (TFF), где жидкость прокачивают насосом тангенциально по отношению к поверхности мембраны для ультрафильтрации. Обычно жидкость концентрата разбавляют буфером для диафильтрации после пропускания над мембраной и затем возвращают на мембрану непрерывным проточным способом. В общем, диафильтрация может быть осуществлена либо в режиме "тупиковой" фильтрации, либо в режиме тангенциально-проточной фильтрации (TFF). В связи с этим, одну систему можно использовать как для операций ультрафильтрации, так и для операций диафильтрации, например, чтобы сначала сконцентрировать образец с использованием ультрафильтрации, а затем осуществить замену буфера диафильтрацией.

В используемом в настоящем описании смысле термин "полиамин" относится к любой группе органических соединений, состоящих из углерода, азота и водорода и содержащих две или больше аминогрупп. Например, термин охватывает молекулы, выбранные из группы, состоящей из кадаверина, путресцина, агматина, орнитина, спермина и спермидина.

В некоторых вариантах химически определенной культуральной среды, используемой для экспрессии белка ADAMTS, концентрация полиамина, присутствующего в среде, находится в диапазоне концентраций приблизительно от 0,5 мг/л до приблизительно 30 мг/л, или приблизительно от 0,5 мг/л до приблизительно 20 мг/л, или приблизительно от 0,5 мг/л до приблизительно 10 мг/л, или приблизительно от 1 мг/л до приблизительно 10 мг/л, или приблизительно от 2 мг/л до приблизительно 10 мг/л, или приблизительно от 2 мг/л до приблизительно 8 мг/л, или приблизительно от 2 мг/л до приблизительно 5 мг/л. В одном конкретном варианте полиамином является путресцин в концентрации приблизительно от 2 мг/л до приблизительно 8 мг/л.

В используемом в настоящем описании смысле термин "химически определенная среда" относится к синтетической ростовой среде, в которой идентифицированы все компоненты и известна их концентрация. Химически определенные среды не содержат бактериальных, дрожжевых, животных или растительных экстрактов, хотя они могут содержать или не содержать отдельные полученные из растений или животных компоненты (например, белки, полипептиды и т.д.). Не ограничивающие примеры коммерчески доступных химически определенных сред включают различные среды EX-CELL® (SAFC Biosciences, Inc.), различные модифицированные по Дульбекко среды Игла (DME) (Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc.), питательную смесь Хама (Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc.), и тому подобные. Способы получения химически определенных культуральных сред известны в данной области и описаны, например, в патентах США № 6171825 и 6936441, WO 2007/077217 и публикациях заявок на выдачу патентов США № 2008/0009040 и 2007/0212770, содержание которых включено в настоящее описание путем ссылки в полном объеме для всех целей.

В используемом в настоящем описании смысле термин "не содержащая олигопептидов среда" относится к не содержащей белков среде, которая не содержит олигопептидов, таких как, например, олигопептиды, полученные из гидролизата белка. В одном варианте среда не содержит олигопептидов, имеющих двадцать или больше аминокислот. В одном варианте осуществления настоящего изобретения среда не содержит олигопептидов, имеющих пятнадцать или больше аминокислот. В другом варианте осуществления изобретения среда не содержит олигопептидов, имеющих десять или больше аминокислот. В одном варианте среда не содержит олигопептидов, имеющих семь или больше аминокислот. В другом варианте среда не содержит олигопептидов, имеющих пять или больше аминокислот. В еще одном варианте среда не содержит олигопептидов, имеющих три или больше аминокислот. Согласно следующему варианту осуществления настоящего изобретения среда не содержит олигопептидов, имеющих две или больше аминокислот. Способы получения не содержащей олигопептидов культуральной среды известны в данной области, например описаны в патентах США № 6171825 и 6936441, в WO 2007/077217 и в публикациях заявок на выдачу патентов США № 2008/0009040 и 2007/0212770, содержание которых включено в настоящее описание путем ссылки в полном объеме для всех целей.

В используемом в настоящем описании смысле термин "бессывороточная культуральная среда" относится к культуральной среде, в которую не добавлена сыворотка животных. Хотя зачастую бессывороточные среды представляют собой химически определенные среды, в бессывороточные среды могут быть добавлены отдельные животные или растительные белки или фракции белков. Способы получения бессывороточной культуральной среды известны в данной области, например, описаны в патентах США № 6171825 и 6936441, в WO 2007/077217 и в публикациях заявок на выдачу патентов США № 2008/0009040 и 2007/0212770, содержание которых включено в настоящее описание путем ссылки в полном объеме для всех целей.

В используемом в настоящем описании смысле термин "культуральная среда, не содержащая животных белков" относится к культуральной среде, которая не дополнена сывороткой, белком или фракцией белка животных. Хотя зачастую культуральные среды, не содержащие животных белков, представляют собой химически определенные среды, культуральные среды, не содержащие животных белков, могут содержать растительные или дрожжевые гидролизаты. Способы получения культуральной среды, не содержащей животных белков, известны в данной области, например, описаны в патентах США № 6171825 и 6936441, WO 2007/077217 и публикациях заявок на выдачу патентов США № 2008/0009040 и 2007/0212770, содержание которых включено в настоящее описание путем ссылки в полном объеме для всех целей.

"Экспрессирующий вектор" представляет собой конструкцию нуклеиновой кислоты, созданную рекомбинантно или синтетически, содержащую ряд специальных элементов нуклеиновой кислоты, которые обеспечивают возможность транскрипции конкретной нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. Экспрессирующий вектор может быть частью плазмиды, вируса или фрагмента нуклеиновой кислоты. Обычно экспрессирующий вектор содержит нуклеиновую кислоту, которую необходимо транскрибировать, функционально связанную с промотором.

Термин "гетерологичный" при использовании в отношении частей нуклеиновой кислоты указывает, что нуклеиновая кислота содержит две или больше подпоследовательностей, которые не встречаются в такой же взаимосвязи друг с другом в природе. Например, нуклеиновую кислоту обычно получают путем рекомбинации, и она имеет две или больше последовательностей из неродственных генов, скомбинированных для того, чтобы получить новую функциональную нуклеиновую кислоту, например, промо-

тор из одного источника и кодирующую область из другого источника. Подобным образом, термин "гетерологичный белок" указывает, что белок содержит две или больше подпоследовательности, которые не встречаются в такой же взаимосвязи друг с другом в природе (например, слитый белок).

"Промотор" определяют как ряд регуляторных последовательностей нуклеиновой кислоты, которые управляют транскрипцией нуклеиновой кислоты. В используемом в настоящем описании смысле промотор содержит необходимые последовательности нуклеиновой кислоты вблизи стартового сайта транскрипции, например, как в случае промотора для полимеразы II, элемент ТАТА. Промотор также необязательно включает дистальные энхансерный или репрессорный элементы, которые могут быть расположены на расстоянии до нескольких тысяч пар оснований от стартового сайта транскрипции. "Конститутивным" промотором является промотор, который активен в большинстве условий окружающей среды и условий развития. "Индукцируемым" промотором является промотор, который активен при регуляции условиями окружающей среды и регуляции в ходе развития. Термин "функционально связанный" относится к функциональной связи между последовательностью регуляции экспрессии нуклеиновой кислоты (такой как промотор или ряд сайтов связывания факторов транскрипции) и второй последовательностью нуклеиновой кислоты, причем последовательность регуляции экспрессии управляет транскрипцией нуклеиновой кислоты, соответствующей второй последовательности.

В используемом в настоящем описании смысле термин "приблизительно" означает приблизительный диапазон плюс или минус 10% от указанного значения. Например, выражение "приблизительно 20%" охватывает диапазон 18-22%.

### III. Экспрессия белков ADAMTS

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина (ADAMTS), обладающего высокой удельной активностью. В одном варианте способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS, в культуральной среде, дополненной по меньшей мере одним компонентом, выбранным из кальция, цинка и никотинамида (витамина B3). В конкретном варианте белок ADAMTS экспрессируется в среде с добавлением по меньшей мере двух компонентов, выбранных из кальция, цинка и никотинамида (витамина B3). В еще одном варианте культуральную среду дополняют кальцием, цинком и никотинамидом (витамином B3). В некоторых вариантах культуральная среда, применяемая для экспрессии белка ADAMTS, может включать не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную среду.

В одном аспекте предлагаются способы получения белка ADAMTS. В одном варианте способы включают стадии культивирования клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS, в культуральной среде, дополненной по меньшей мере одним компонентом из цинка, кальция и никотинамида; извлечения фракции супернатанта из культуры; осуществления стадии центрифугирования или фильтрации, чтобы удалить любые остаточные клетки; осуществления стадии ультрафильтрации, чтобы сконцентрировать белок ADAMTS; и осуществления стадии диафильтрации с использованием буфера, содержащего, по меньшей мере, кальций или цинк. В некоторых вариантах концентрация кальция может составлять по меньшей мере приблизительно 0,1, 0,3, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3, 5 или более 5 мМ кальция. В других вариантах концентрация цинка может составлять по меньшей мере приблизительно 0,5, 1, 2, 3, 5, 10 или более 10 мкМ цинка. В некоторых вариантах собранный материал, бесклеточный супернатант или буфер для диафильтрации содержит комбинацию кальция и цинка в указанных выше концентрациях. В некоторых вариантах предел отсека мембран для ультрафильтрации и/или диафильтрации может составлять, например, приблизительно 150 или 125, или 100, или 75, или 50, или 30, или 10, или менее 10 кД. В некоторых вариантах белком ADAMTS является ADAMTS13 или его биологически активное производное. В конкретном варианте белком ADAMTS13 является белок ADAMTS13 человека или его биологически активное производное. В некоторых вариантах культуральной средой, применяемой в способе, может быть не содержащая животных белков, не содержащая олигопептидов или химически определенная среда.

В одном варианте способ дополнительно включает стадию очистки, выбранную из группы, состоящей из ионообменной хроматографии, эксклюзионной хроматографии по размеру, аффинной хроматографии и хроматографии на основе гидрофобного взаимодействия.

В еще одном варианте добавка цинка может быть осуществлена путем добавления препарата белка или полипептида, содержащего цинк. Например, обычные препараты инсулина содержат цинк в таких концентрациях, что добавление в среду приблизительно от 1 мг/л до приблизительно 10 мг/л инсулина также может приводить к добавлению приблизительно от 0,03 мкМ до приблизительно 1,5 мкМ цинка, как рассчитано на основе подробной монографии для новолена N InnoLet SubQ, рекомбинантного инсулина человека, которую можно найти на сервере Medscape. Соответственно, в одном варианте культуральная среда, применяемая для экспрессии белка ADAMTS, может быть дополнена содержащим цинк препаратом инсулина.

Базовая среда, которую дополняют цинком, кальцием и/или никотинамидом (витамином B3), как описано в настоящей публикации, выбранная для культивирования линии клеток хозяев, не является решающей для настоящего изобретения и может быть любой средой или сочетанием сред, известных в

данной области, которые подходят для культивирования клеток млекопитающих. Такие среды, как модифицированная по Дульбекко среда Игла, среда Хама F-12, минимальная необходимая среда Игла и среда RPMI-1640 и тому подобное, являются коммерчески доступными. Добавление факторов роста, таких как рекомбинантный инсулин, является необязательным.

В одном варианте базовая среда, применяемая для культивирования клетки, экспрессирующей белок ADAMTS (например, ADAMTS13), может содержать смесь одной или нескольких коммерчески доступных химически определенных сред, например, модифицированной по Дульбекко среды Игла (DMEM) и среды Хама F-12, которая дополнена одним или несколькими другими компонентами, отличными от цинка, кальция и никотинамида (витамина B3). Не ограничивающие примеры компонентов, которые можно использовать для дополнения коммерчески доступной среды, включают незаменимые аминокислоты (например, глутамин), неионогенные поверхностно-активные вещества (например, синпероник), первичные амины (например, этаноламин), полиамины (например, путресцин), следовые количества металлов (например, железа) и буферные средства (например, бикарбонат натрия). В конкретном варианте средой является среда BCS, которая представлена в табл. 1. В другом конкретном варианте среда представляет собой среду BACD, например среду BACD-A13.

Таблица 1. Состав среды для культивирования клеток BCS

Компонент	Концентрация [г/кг]
DMEM/HAМ'S F12	11,75
L- глутамин	0,9
Синпероник	1,00
Этаноламин	0,00153
Путресцин · 2HCl	0,0036
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,0006
NaHCO <sub>3</sub>	2,0

Исторически, клетки животных культивировали в средах, содержащих сыворотку животных. Однако такие среды не полностью определены и несут риск инфекции. Поэтому специалисты в данной области разработали "не содержащие белков" среды, которые либо совсем не содержат никаких белков, либо не содержат, по меньшей мере, какого-либо белка, который не получен рекомбинантно. Сывороточный альбумин человека обычно используют в качестве добавки в бессывороточную культуру для получения рекомбинантных белков. Предпочтительные среды включают среды, описанные в патентах США № 6171825 и 6936441, в WO 2007/077217 и в публикациях заявок на выдачу патентов США № 2008/0009040 и 2007/0212770.

Необязательно, неионогенное поверхностно-активное вещество, такое как полипропиленгликоль (например, плуроник® F-61, плуроник® F-68, плуроник® F-71, плуроник® F-108 или синпероник®), может быть добавлено в среду в качестве противопенного средства. Такое средство обычно применяют для защиты клеток от негативного действия аэрации ("барботирования"). Количество неионогенного поверхностно-активного вещества может быть в диапазоне от 0,05 до 10 г/л, предпочтительно от 0,1 до 5 г/л.

Среда, описанная в US 6936441, особенно хорошо подходит для культивирования клеток CHO, но также может быть использована для других клеток. Другой подходящей средой является не содержащая олигопептидов среда, описанная в заявке на выдачу патента США № 2007/0212770 (Baxter International Inc., Baxter Healthcare S.A.).

Таблица 2. Примеры концентраций цинка, кальция и никотинамида (витамина В3), которые могут быть использованы для добавок в культуральные среды, применимые для экспрессии белка ADAMTS

По меньшей мере 2 мкМ цинка	Вар. 1	По меньшей мере 0,5 мМ кальция	Вар. 2	По меньшей мере 2 мг/л никотинамида	Вар. 3
По меньшей мере 5 мкМ цинка	Вар. 4	По меньшей мере 1,5 мМ кальция	Вар. 5	По меньшей мере 7 мг/л никотинамида	Вар. 6
От 2 до 12 мкМ цинка	Вар. 7	От 0,5 до 1,5 мМ кальция	Вар. 8	От 2 до 7 мг/л никотинамида	Вар. 9
От 5 мкМ до 12 мкМ цинка	Вар. 10	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 больше кальция	Вар. 11	По меньшей мере 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 больше никотинамида	Вар. 12
По меньшей мере 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 больше цинка	Вар. 13				

\*Вар. = Вариант

В одном варианте настоящее изобретение относится к способу экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина (ADAMTS), причем способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS, в культуральной среде, содержащей по меньшей мере один из компонентов: цинк в концентрации по меньшей мере приблизительно 2 мкМ или кальций в концентрации по меньшей мере приблизительно 0,5 мМ. В одном варианте белком ADAMTS является ADAMTS1. В другом варианте белком ADAMTS является ADAMTS2. В другом варианте белком ADAMTS является ADAMTS3. В другом варианте белком ADAMTS является ADAMTS4. В другом варианте белком ADAMTS является ADAMTS5. В другом варианте белком ADAMTS является ADAMTS6. В другом варианте белком ADAMTS является ADAMTS7. В другом варианте белком ADAMTS является ADAMTS8. В другом варианте белком ADAMTS является ADAMTS9. В другом варианте белком ADAMTS является ADAMTS10. В другом варианте белком ADAMTS является ADAMTS11. В другом варианте белком ADAMTS является ADAMTS12. В другом варианте белком ADAMTS является ADAMTS13. В другом варианте белком ADAMTS является ADAMTS14. В другом варианте белком ADAMTS является ADAMTS15. В другом варианте белком ADAMTS является ADAMTS16. В другом варианте белком ADAMTS является ADAMTS17. В другом варианте белком ADAMTS является ADAMTS18. В другом варианте белком ADAMTS является ADAMTS19. В другом варианте белком ADAMTS является ADAMTS20. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В одном варианте культуральная среда содержит по меньшей мере приблизительно 2 мкМ цинка. В другом варианте культуральная среда содержит приблизительно от 2 мкМ до приблизительно 12 мкМ цинка. В еще одном варианте культуральная среда содержит по меньшей мере приблизительно 5 мкМ цинка. В одном варианте культуральная среда содержит приблизительно от 5 мкМ до приблизительно 12 мкМ цинка. В другом варианте культуральная среда содержит по меньшей мере приблизительно 0,5 мМ кальция. В еще одном варианте культуральная среда содержит приблизительно от 0,5 мМ до приблизительно 1,5 мМ кальция. В одном варианте культуральная среда содержит по меньшей мере приблизительно 2 мкМ цинка и по меньшей мере приблизительно 0,5 мМ кальция.

В следующих вариантах было обнаружено, что добавление никотинамида (витамина В3) дополнительно усиливает экспрессию и повышает удельную активность белков ADAMTS в культуре клеток. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит по меньшей мере приблизительно 2 мг/л никотинамида (витамина В3). В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит по меньшей мере приблизительно 7 мг/л никотинамида (витамина В3). В еще одном варианте культуральная среда содержит приблизительно от 2 мг/л до приблизительно 10 мг/л никотинамида (витамина В3).

В некоторых вариантах культуральная среда представляет собой не содержащую животных белков культуральную среду. В другом варианте культуральная среда представляет собой химически определенную среду. В некоторых вариантах культуральная среда может содержать один или несколько поли-

аминов. В конкретном варианте полиамином является путресцин, например, в концентрации по меньшей мере 0,5 мг/л. В конкретном варианте культуральная среда содержит приблизительно от 2 мг/л до приблизительно 8 мг/л путресцина.

В некоторых вариантах клетка или линия клеток, используемых в культуре, представляет собой бактериальную клетку, дрожжевую клетку, клетку насекомого, клетку птицы или клетку млекопитающего. В конкретном варианте линия клеток представляет собой линию клеток человека, линию клеток хомячка или линию клеток мыши. В более конкретном варианте линией клеток является линия клеток СНО, ВНК или НЕК. В предпочтительном варианте линией клеток является линия клеток СНО.

В некоторых вариантах нуклеиновая кислота, кодирующая белок ADAMTS, содержит регуляторную последовательность, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок ADAMTS. В одном варианте регуляторной последовательностью является промотор. В некоторых вариантах промотор является конститутивным промотором. В других вариантах промотор является индуцируемым промотором.

В некоторых вариантах способы, предлагаемые в настоящем описании, включают применение системы непрерывной культуры клеток (т.е. непрерывное культивирование клеток). В одном варианте система непрерывной культуры представляет собой систему хемотатной культуры (т.е. культивирование клеток в хемотате). В другом варианте система непрерывной культуры представляет собой систему турбидостатной культуры (т.е. культивирование клеток в турбидостате). В еще одном варианте система непрерывной культуры представляет собой систему перфузируемой культуры (т.е. культивирование клеток с перфузией). В некоторых вариантах система непрерывной культуры может функционировать в режиме суспензии. В других вариантах система непрерывной культуры может функционировать в режиме прикрепления клеток. В некоторых вариантах режим прикрепления включает использование микроносителя, например, пористого микроносителя.

В некоторых вариантах способы, предлагаемые в изобретении, включают применение системы периодической культуры клеток (т.е. периодическое культивирование клеток). В одном варианте система периодической культуры представляет собой систему культуры в виде отдельных партий (т.е. культивирование по одной партии культуры). В другом варианте система периодической культуры представляет собой систему культуры с подпиткой (т.е. культивирование клеток с подпиткой). В еще одном варианте система периодической культуры представляет собой систему культуры с выходом множества партий (т.е. культивирование с многократным получением партий). В некоторых вариантах система периодической культуры может функционировать в режиме суспензии. В других вариантах система периодической культуры может функционировать в режиме прикрепления. В некоторых вариантах режим прикрепления включает использованием микроносителя, например, пористого микроносителя.

В некоторых вариантах культуру можно поддерживать при температуре приблизительно от 35°C до приблизительно 37°C. В других вариантах культуру можно поддерживать при pH приблизительно от 6,9 до приблизительно 7,3. В конкретном варианте культуру можно поддерживать при pH приблизительно от 7,05 до приблизительно 7,15.

В некоторых вариантах способы, предлагаемые в настоящем изобретении, будут давать белки ADAMTS13 в культуральной среде (т.е. экспрессируемые ADAMTS13) с удельными активностями, составляющими по меньшей мере 600 единиц на миллиграмм белка ADAMTS13. В других вариантах удельная активность может составлять по меньшей мере 800 единиц на миллиграмм белка ADAMTS13. В других вариантах удельная активность может составлять по меньшей мере 1000 единиц на миллиграмм белка ADAMTS13. В других вариантах удельная активность может составлять по меньшей мере 1500 единиц на миллиграмм белка ADAMTS13. В других вариантах удельная активность может составлять по меньшей мере 2000 единиц на миллиграмм белка ADAMTS13.

В других вариантах способы обеспечивают получение культур, которые дают по меньшей мере 400 единиц активности ADAMTS13 на литр культуры в сутки (единиц/л/сутки). В одном варианте способы обеспечивают получение культур, которые дают по меньшей мере 800 единиц активности ADAMTS13 на литр культуры в сутки (единиц/л/сутки).

#### A. ADAMTS13

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам экспрессии белка ADAMTS13, обладающего повышенной общей и/или удельной активностью. Было обнаружено, что предпочтительно путем дополнения ростовой среды кальцием, цинком и/или никотинамидом (витамином В3) полипептиды ADAMTS13, обладающие высокой удельной активностью, могут быть рекомбинантно экспрессированы и извлечены из культуры клеток.

Способы экспрессии ADAMTS13 предложены в публикации WO 2009/086309, содержание которой включено в настоящее описание путем ссылки в полном объеме для всех целей. В указанной публикации описаны подходящие способы и условия культивирования, которые можно поддерживать на протяжении культивирования. Как описано в настоящей публикации, культуры клеток, используемые для экспрессии белков ADAMTS13, обычно можно поддерживать при температуре приблизительно от 34 до 37°C и pH приблизительно от 6,8 до 7,3.

Способы контроля температуры и pH при культивировании хорошо известны в данной об-

ласти и, как правило, основаны на использовании датчиков, которых помещают в биореактор или помещают в петли, по которым циркулирует культуральная среда, или помещают в отбираемые образцы культуральной среды. Подходящие встроенные в систему рН-сенсоры включают сенсор Mettler Toledo InPro 3100/125/Pt100 (Mettler-Toledo Ingold, Inc., Bedford, MA). Способы изменения конкретного параметра для того, чтобы поддерживать его на предварительно определяемом уровне, также хорошо известны. Например, поддержание постоянной температуры обычно заключается в нагревании или охлаждении биореактора или подаваемой среды (если осуществляют процесс с подпиткой или непрерывный процесс); поддержание постоянного рН обычно заключается в подборе и введении достаточного количества подходящего буфера (обычно бикарбоната) и добавление при необходимости кислоты, такой как хлористо-водородная кислота, или щелочи, такой как гидроксид натрия, бикарбонат натрия или их смесь, в подаваемую среду для подпитки. Возможно калибровка встроенного в систему датчика рН может отклоняться с течением времени, например, в течение периодов времени, составляющих дни или недели, в течение которых культивируют клетки. В таком случае может быть полезным повторная установка встроенного в систему датчика с использованием измерений, полученных от недавно откалиброванного дополнительного, не входящего в систему датчика.

В одном варианте способы включают культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, дополненной по меньшей мере одним компонентом, выбранным из кальция, цинка и никотинамида (витамина В3). В конкретном варианте белок ADAMTS экспрессируется в среде, дополненной по меньшей мере двумя компонентами, выбранными из кальция, цинка и никотинамида (витамина В3). В еще одном варианте культуральная среда дополнена кальцием, цинком и никотинамидом (витамином В3). В некоторых вариантах культуральная среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную культуральную среду.

#### 1. Добавка цинка

Преимущественно было обнаружено, что повышенная ферментативная активность и удельная активность ADAMTS13 может быть извлечена из культуры клеток, выращенной в среде, дополненной цинком. Например, в примере 1 показано, что белок ADAMTS13, экспрессированный в культуральной среде, содержащей 1,432 мг/л  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (5 мкМ цинка), имеет на 40-100% более высокую удельную активность, чем белок ADAMTS13, экспрессированный в культуральной среде, содержащей только 0,432 мг/л  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (1,5 мкМ цинка) (сравн. табл. 10 и 11). Кроме того, такой эффект воспроизводим, как показано в примере 2 (сравн. таблицу 13 и 14); примере 4 (табл. 16 и 19); и примере 5 (табл. 20 и 21).

Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к способам экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), обладающего повышенной удельной активностью, посредством культивирования клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в культуральной среде, дополненной цинком, например, содержащей по меньшей мере 2 мкМ цинка. Подобным образом, настоящее изобретение также относится к способам получения композиции белка ADAMTS (например, композиции ADAMTS13), имеющей повышенную общую активность или удельную активность, посредством культивирования клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в культуральной среде, дополненной цинком, например, содержащей по меньшей мере 2 мкМ цинка.

В одном варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ цинка. В другом варианте способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка. В одном варианте культуральная среда содержит точно или приблизительно от 2 до 12 мкМ цинка. В другом варианте культуральная среда содержит точно или приблизительно от 5 до 12 мкМ цинка. В следующих вариантах культуральная среда может содержать, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или больше цинка. Подходящие диапазоны концентрации цинка обычно определяют по токсичности для культуры клеток, которая может возникать в присутствии высоких концентраций цинка, например, при концентрациях выше 20, 25, 30, 40 мкМ и тому подобное. Как будет понятно специалисту в данной области, степень, в которой концентрации цинка являются ингибирующими для конкретной системы культивирования, будет в высокой степени зависеть, наряду с другими факторами, от типа клетки, используемой для экспрессии белка ADAMTS, компонентов используемой культуральной среды и рабочего режима, используемого для культивирования (например, периодический по сравнению с непрерывным; суспензия по сравнению с прикрепленными клетками; хемостат по сравнению с перфузией; и т.д.). В некоторых случаях могут потребоваться более высокие концентрации цинка, когда компоненты культуральной среды могут связывать цинк из раствора, например, в случаях, когда культуральная среда содержит альбумин. Соответственно, подходящие диапазоны концентрации цинка обычно определяют в соответствии с типом культиви-

вируемых клеток, используемой средой и рабочим режимом. Специалист легко сможет определить подходящие верхние пределы использования добавки цинка на основании используемой индивидуальной системы культивирования.

В одном варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрина и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), включающий культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ цинка. В другом варианте способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка. В одном варианте не содержащая животных белков и/или полипептидов культуральная среда содержит точно или приблизительно от 2 до 12 мкМ цинка. В другом варианте не содержащая животных белков и/или полипептидов культуральная среда содержит точно или приблизительно от 5 до 12 мкМ цинка. В следующих вариантах не содержащая животных белков и/или полипептидов культуральная среда может содержать, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или больше цинка. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, равной или приблизительно составляющей от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, равной или приблизительно составляющей от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

В другом варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрина и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), включающий культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в химически определенной культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ цинка. В другом варианте способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в химически определенной культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка. В одном варианте химически определенная культуральная среда содержит точно или приблизительно от 2 до 12 мкМ цинка. В другом варианте химически определенная культуральная среда содержит точно или приблизительно от 5 до 12 мкМ цинка. В следующих вариантах не содержащая животных белков и/или полипептидов культуральная среда может содержать, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или больше цинка. В некоторых вариантах химически определенная среда не будет содержать полученных от животных белков и/или полипептидов. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, равной или приблизительно составляющей от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, равной или приблизительно составляющей от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин. В одном варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрина и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (AQAMTS13), причем способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущего нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ цинка. В другом варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка. В одном варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей точно или приблизительно от 2 до 12 мкМ цинка. В другом варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей точно или приблизительно от 5 до 12 мкМ цинка. В следующих вариантах способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ или по меньшей мере приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или больше цинка. В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток CHO, линия клеток HEK 293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, равной или приблизительно составляющей от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, равной или приблизительно составляющей от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

В одном варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрина и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ цинка, в условиях непрерывного культивирования или куль-

тивирования с подпиткой. В другом варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка, в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В одном варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей точно или приблизительно от 2 до 12 мкМ цинка, в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В другом варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей точно или приблизительно от 5 до 12 мкМ цинка, в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В следующих вариантах способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или больше цинка, в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В конкретном варианте условиях непрерывного культивирования являются условия культивирования в хемостате. В другом конкретном варианте условия непрерывного культивирования представляют собой условия культивирования с перфузией. В одном варианте клеткой, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, является клетка млекопитающего. В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток CHO, линия клеток HEK293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, равной или приблизительно составляющей от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, равной или приблизительно составляющей от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

В другом варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ цинка, при этом культуру поддерживают при температуре, равной или приблизительно составляющей от 35 до 37°C. В другом варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка, при этом культуру поддерживают при температуре, равной или приблизительно составляющей от 35 до 37°C. В одном варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей точно или приблизительно от 2 до 12 мкМ цинка, при этом культуру поддерживают при температуре, равной или приблизительно составляющей от 35 до 37°C. В другом варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей точно или приблизительно от 5 до 12 мкМ цинка, при этом культуру поддерживают при температуре, равной или приблизительно составляющей от 35 до 37°C. В следующих вариантах способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или больше цинка, при этом культуру поддерживают при температуре, равной или приблизительно составляющей от 35 до 37°C. В конкретном варианте культуру поддерживают при температуре, равной или приблизительно составляющей 36°C. В одном варианте температуру культуры поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток. В одном варианте способ осуществляют в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования в хемостате. В другом конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования с перфузией. В одном варианте клеткой, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, является клетка млекопитающего. В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток CHO, линия клеток HEK293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, равной или приблизительно составляющей от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, равной или приблизительно составляющей от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

В другом варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ цинка, при этом pH культуры поддерживают на уровне или приблизительно от 6,9 до 7,3. В другом варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка, при этом pH культуры поддерживают на уровне или приблизительно от 6,9 до 7,3. В одном варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей точно или приблизительно от 2 до 12 мкМ цинка, при этом pH культуры поддерживают на уровне или приблизительно от 6,9 до 7,3. В другом варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей точно или приблизительно от 5 до 12 мкМ цинка, при этом pH культуры поддерживают на уровне или приблизительно от 6,9 до 7,3. В следующих вариантах способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или больше цинка, при этом pH культуры поддерживают на уровне или приблизительно от 6,9 до 7,3. В одном варианте культуру поддерживают при температуре, равной или приблизительно составляющей от 35 до 37°C. В конкретном варианте культуру поддерживают при температуре, равной или приблизительно составляющей 36°C. В одном варианте температуру и/или pH культуры поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток. В одном варианте способ осуществляют в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования в хемостате. В другом конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования с перфузией. В одном варианте клеткой, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, является клетка млекопитающего. В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток CHO, линия клеток НЕК293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, равной или приблизительно составляющей от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, равной или приблизительно составляющей от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

В одном варианте культуральная среда, применяемая для экспрессии белка ADAMTS, может быть дополнена цинком в конечной концентрации, составляющей по меньшей мере приблизительно от 2 мкМ до по меньшей мере приблизительно 12 мкМ. В некоторых вариантах культуральная среда может быть дополнена цинком в конечной концентрации, составляющей по меньшей мере приблизительно 2 мкМ или по меньшей мере приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или более высокие уровни цинка. Как правило, можно использовать любую соль цинка для дополнения среды согласно изобретению, не ограничивающие примеры приемлемых солей включают  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $ZnSO_3 \cdot 2H_2O$ ,  $(C_6H_5O_7)_2Zn_3 \cdot 2H_2O$ ,  $ZnBr_2$ ,  $ZnBr_2 \cdot 2H_2O$ ,  $ZnCl_2$ ,  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ,  $Zn(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$ ,  $(C_2H_3O_2)_2Zn \cdot 2H_2O$  и тому подобное. В некоторых вариантах фармацевтически приемлемую соль цинка используют для дополнения культуральных сред согласно изобретению.

## 2. Добавка кальция

Было успешно обнаружено, что повышенная ферментативная активность и удельная активность ADAMTS13 может быть извлечена из культуры клеток, выращенной в среде, дополненной кальцием. Традиционные среды для культивирования клеток, например DMEM/F12, обычно содержали приблизительно 1 мМ кальция. Исторически такие высокие уровни кальция вводили в среду, способствующую росту культур прикрепленных клеток. Однако в настоящее время коммерчески доступные среды, предназначенные для суспензионных культур, содержат значительно более низкие уровни кальция, например приблизительно 0,1 мМ кальция. Такие более низкие уровни кальция используют исходя из того, что необходимо предотвратить агрегацию клеток, культивируемых способами на основе выращивания в суспензии. Известно, что более низкие уровни кальция достаточны для размножения клеток в суспензии и экспрессии рекомбинантных белков, однако авторы изобретения обнаружили, что такие низкие уровни кальция недостаточны для экспрессии белков ADAMTS (например, ADAMTS13).

Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к способам экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), обладающего повышенной удельной активностью, посредством культивирования клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в культуральной среде, дополненной кальцием, например, содержащей по меньшей мере

0,5 мМ кальция. Подобным образом, настоящее изобретение также относится к способам получения композиции белка ADAMTS (например, композиции ADAMTS13), обладающего повышенной общей активностью или удельной активностью, посредством культивирования клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в культуральной среде, дополненной кальцием, например, содержащей по меньшей мере 0,5 мМ кальция.

В одном варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция. В другом варианте способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 1,5 мМ кальция. В одном варианте культуральная среда содержит точно или приблизительно от 0,5 до 1,5 мМ кальция. В других вариантах культуральная среда может содержать, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 мМ или больше кальция.

В одном варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), включающий культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция. В другом варианте способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 1,5 мМ кальция. В одном варианте не содержащая животных белков и/или полипептидов культуральная среда содержит точно или приблизительно от 0,5 до 1,5 мМ кальция. В других вариантах не содержащая животных белков и/или полипептидов культуральная среда может содержать, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 мМ или больше кальция. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

В другом варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), включающий культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в химически определенной культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция. В другом варианте способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в химически определенной культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 1,5 мМ кальция. В одном варианте химически определенная культуральная среда содержит точно или приблизительно от 0,5 до 1,5 мМ кальция. В других вариантах не содержащая животных белков и/или полипептидов культуральная среда может содержать, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 мМ или больше кальция. В некоторых вариантах химически определенная среда не будет содержать полученных от животного белков и/или полипептидов. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин. В одном варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция. В другом варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 1,5 мМ кальция. В одном варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей точно или приблизительно от 0,5 до 1,5 мМ кальция. В следующих вариантах способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 или, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 мМ или больше кальция. В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток CHO, линия клеток HEK293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая

может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

В одном варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция, в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В другом варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 1,5 мМ кальция, в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В одном варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей точно или приблизительно от 0,5 до 1,5 мМ кальция, в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В следующих вариантах способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 или, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 мМ или больше кальция, в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования в хемостате. В другом конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования с перфузией. В одном варианте клеткой, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, является клетка млекопитающего. В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток CHO, линия клеток HEK293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

В другом варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция, при этом культуру поддерживают при температуре, равной или приблизительно составляющей от 35 до 37°C. В другом варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 1,5 мМ кальция, при этом культуру поддерживают при температуре, равной или приблизительно составляющей от 35 до 37°C. В одном варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей точно или приблизительно от 0,5 до 1,5 мМ кальция, при этом культуру поддерживают при температуре, равной или приблизительно составляющей от 35 до 37°C. В других вариантах способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 мМ или больше кальция, при этом культуру поддерживают при температуре, равной или приблизительно составляющей от 35 до 37°C. В конкретном варианте культуру поддерживают при температуре, равной или приблизительно составляющей 36°C. В одном варианте температуру культуры поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток. В одном варианте способ осуществляют в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования в хемостате. В другом конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования с перфузией. В одном варианте клеткой, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, является клетка млекопитающего. В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток CHO, линия клеток HEK293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концен-

трации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

В другом варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция, при этом рН культуры поддерживают точно или приблизительно на уровне от 6,9 до 7,3. В другом варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 1,5 мМ кальция, при этом рН культуры поддерживают точно или приблизительно на уровне от 6,9 до 7,3. В одном варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей точно или приблизительно от 0,5 до 1,5 мМ кальция, при этом рН культуры поддерживают точно или приблизительно на уровне от 6,9 до 7,3. В следующих вариантах способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 мМ или больше кальция, при этом рН культуры поддерживают точно или приблизительно на уровне от 6,9 до 7,3. В одном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно от 35 до 37°C. В конкретном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно 36°C. В одном варианте температуру и/или рН культуры поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток. В одном варианте способ осуществляют в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования в хемостате. В другом конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования с перфузией. В одном варианте клеткой, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, является клетка млекопитающего. В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток CHO, линия клеток HEK293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

В другом варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ цинка. В родственном варианте культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка. В другом родственном варианте культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно от 2 до 12 мкМ цинка. В другом родственном варианте культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно от 5 до 12 мкМ цинка. В некоторых вариантах культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или больше цинка. В одном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно от 35 до 37°C. В конкретном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно 36°C. В одном варианте температуру и/или рН культуры поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток. В одном варианте способ осуществляют в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования в хемостате. В другом конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования с перфузией. В одном варианте клеткой, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, является клетка млекопитающего. В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток CHO, линия клеток HEK293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда

дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

В другом варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 1,5 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ цинка. В родственном варианте культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 1,5 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка. В другом родственном варианте культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 1,5 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно от 2 до 12 мкМ цинка. В еще одном родственном варианте культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 1,5 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно от 5 до 12 мкМ цинка. В некоторых вариантах культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 1,5 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или больше цинка. В одном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно от 35 до 37°C. В конкретном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно 36°C. В одном варианте температуру и/или pH культуры поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток. В одном варианте способ осуществляют в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования в хемостате. В другом конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования с перфузией. В одном варианте клеткой, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, является клетка млекопитающего. В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток CHO, линия клеток HEK293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

В другом варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно от 0,5 до 1,5 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ цинка. В родственном варианте культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно от 0,5 до 1,5 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка. В другом родственном варианте культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно от 0,5 до 1,5 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно от 2 до 12 мкМ цинка. В еще одном родственном варианте культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно от 0,5 до 1,5 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно от 5 до 12 мкМ цинка. В некоторых вариантах культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно от 0,5 до 1,5 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или больше цинка. В одном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно от 35 до 37°C. В конкретном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно 36°C. В одном варианте температуру и/или pH культуры поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток. В одном варианте способ осуществляют в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования в хемостате. В другом конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования с перфузией. В одном варианте клеткой, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, является клетка млекопитающего. В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток CHO, линия клеток HEK293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополни-

тельно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

В другом варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрина и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 мМ или больше кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ цинка. В родственном варианте культуральная среда содержит точно или приблизительно 0,5 мМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 мМ или больше кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка. В другом родственном варианте культуральная среда содержит точно или приблизительно 0,5 мМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 мМ или больше кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно от 5 до 12 мкМ цинка. В некоторых вариантах культуральная среда содержит точно или приблизительно 0,5 мМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 мМ или больше кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или больше цинка. В одном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно от 35 до 37°C. В конкретном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно 36°C. В одном варианте температуру и/или pH культуры поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток. В одном варианте способ осуществляют в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования в хеостате. В другом конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования с перфузией. В одном варианте клеткой, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, является клетка млекопитающего. В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток CHO, линия клеток НЕК293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

Как правило, можно использовать любую соль кальция для дополнения среды согласно изобретению. Не ограничивающие примеры приемлемых солей включают  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaFPO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaI}_2$ ,  $\text{CaBr}_2$ ,  $(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2\text{Ca}$ ,  $(\text{CHO}_2)_2\text{Ca}$ ,  $(\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6)_2\text{Ca}$ ,  $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2\text{Ca}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  и тому подобное. В некоторых вариантах используют фармацевтически приемлемую соль кальция для дополнения культуральных сред согласно изобретению.

### 3. Добавка никотинамида (витамина В3)

Было успешно обнаружено, что повышенная ферментативная активность и удельная активность ADAMTS13 может быть извлечена из культуры клеток, выращенной в среде, дополненной никотинамидом (витамином В3). Например, пример 2 показывает, что белок ADAMTS13, экспрессированный в культуральной среде, содержащей 7 мг/л никотинамида (витамина В3), обладает на 60% более высокой удельной активностью, чем белок ADAMTS13, экспрессированный в культуральной среде, содержащей только 2 мг/л никотинамида (табл. 13; сравн. дни 4 и 7 с 11 днем). Удивительно, что такое действие является синергетическим с действием добавки цинка, так как экспрессия ADAMTS13 в среде, содержащей 7 мг/л никотинамида (витамина В3) и 5 мкМ цинка, приводит к увеличению удельной активности белка ADAMTS13 на 200-300% (сравн. табл. 14 (11 день) с табл. 13 (4 и 7 дни)).

Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к способам экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), обладающего повышенной удельной активностью, посредством культивирования клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в культуральной среде, дополненной никотинамидом (витамином В3), например, содержащей по меньшей мере 2 мг/л никотинамида (витамина В3). Подобным образом, настоящее изобретение также относится к способам получения композиции белка ADAMTS (например, композиции ADAMTS13), обладающего повышенной общей активностью или удельной активностью, посредством

культивирования клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в культуральной среде, дополненной никотинамидом (витамином B3), например, содержащей по меньшей мере 2 мг/л никотинамида (витамина B3).

В одном варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мг/л никотинамида (витамина B3). В другом варианте способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 7 мг/л никотинамида (витамина B3). В одном варианте культуральная среда содержит точно или приблизительно от 2 до 10 мг/л никотинамида (витамина B3). В других вариантах культуральная среда может содержать, по меньшей мере, точно или приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мг/л или более высокие концентрации никотинамида (витамина B3). Подходящие диапазоны концентраций никотинамида (витамина B3) обычно определяют на основании токсичности для культуры клеток, которая может возникать в присутствии высоких концентраций никотинамида (витамина B3), например, при концентрациях выше чем 15, 20, 30, 40 мг/л и тому подобное. Как будет понятно специалисту в данной области, степень, в которой концентрации никотинамида (витамина B3) ингибируют конкретную систему культивирования, будет в значительной мере зависеть, наряду с другими факторами, от типа клетки, используемой для экспрессии белка ADAMTS, компонентов используемой культуральной среды и рабочего режима, используемого для культивирования (например, периодический по сравнению с непрерывным; суспензия по сравнению с прикрепленными клетками; хеостат по сравнению с перфузией; и т.д.). В некоторых случаях могут требоваться более высокие концентрации никотинамида (витамина B3), когда компоненты культуральной среды могут связывать никотинамид (витамина B3) из раствора. Соответственно, подходящие диапазоны концентраций никотинамида (витамина B3) обычно определяют в соответствии с типом культивируемых клеток, используемой средой и рабочим режимом. Специалист легко сможет определить подходящие верхние пределы использования добавки никотинамида (витамина B3) на основании используемой индивидуальной системы культивирования.

В одном варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), включающий культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мг/л никотинамида (витамина B3). В другом варианте способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 7 мг/л никотинамида (витамина B3). В одном варианте не содержащая животных белков и/или полипептидов культуральная среда содержит точно или приблизительно от 2 до 10 мг/л никотинамида (витамина B3). В других вариантах не содержащая животных белков и/или полипептидов культуральная среда может содержать, по меньшей мере, точно или приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мг/л или более высокие концентрации никотинамида (витамина B3). В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

В другом варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), включающий культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в химически определенной культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мг/л никотинамида (витамина B3). В другом варианте способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в химически определенной культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 7 мг/л никотинамида (витамина B3). В одном варианте химически определенная культуральная среда содержит точно или приблизительно от 2 до 10 мг/л никотинамида (витамина B3). В других вариантах не содержащая животных белков и/или полипептидов культуральная среда может содержать, по меньшей мере, точно или приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мг/л или более высокие концентрации никотинамида (витамина B3). В некоторых вариантах химически определенная среда не будет содержать полученных от животного белков и/или полипептидов. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин. В одном варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мг/л никотинамида (витамина B3). В другом варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую ки-

слоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 7 мг/л никотинамида (витамина В3). В одном варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей точно или приблизительно от 2 до 10 мг/л никотинамида (витамина В3). В других вариантах способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мг/л или более высокие концентрации никотинамида (витамина В3). В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток CHO, линия клеток HEK293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

В одном варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мг/л никотинамида (витамина В3), в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В другом варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 7 мг/л никотинамида (витамина В3), в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В одном варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей точно или приблизительно от 2 до 10 мг/л никотинамида (витамина В3), в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В следующих вариантах способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мг/л или более высокие концентрации никотинамида (витамина В3), в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования в хеостате. В другом конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования с перфузией. В одном варианте клеткой, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, является клетка млекопитающего. В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток CHO, линия клеток HEK293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

В другом варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мг/л никотинамида (витамина В3), при этом культуру поддерживают при температуре, равной или приблизительно составляющей от 35 до 37°C. В другом варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 7 мг/л никотинамида (витамина В3), при этом культуру поддерживают при температуре, равной или приблизительно составляющей от 35 до 37°C. В одном варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей точно или приблизительно от 2 до 10 мг/л никотинамида, при этом культуру поддерживают при температуре, равной или приблизительно составляющей от 35 до 37°C. В других вариантах способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мг/л или более высокие концентрации никотинамида (витамина В3), при этом культуру поддерживают при температуре, равной или приблизительно составляющей от 35 до 37°C. В конкретном варианте культуру поддерживают при температуре, равной или приблизительно составляющей 36°C. В одном варианте температуру культуры поддерживают в течение по меньшей мере 7

суток. В одном варианте способ осуществляют в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования в хемостате. В другом конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования с перфузией. В одном варианте клеткой, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, является клетка млекопитающего. В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток CHO, линия клеток HEK293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

В другом варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мг/л никотинамида (витамина В3), при этом рН культуры поддерживают на уровне точно или приблизительно от 6,9 до 7,3. В другом варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 7 мг/л никотинамида (витамина В3), при этом рН культуры поддерживают на уровне точно или приблизительно от 6,9 до 7,3. В одном варианте способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей точно или приблизительно от 2 до 10 мг/л никотинамида (витамина В3), при этом рН культуры поддерживают на уровне точно или приблизительно от 6,9 до 7,3. В других вариантах способ включает культивирование клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мг/л или более высокие концентрации никотинамида (витамина В3), при этом рН культуры поддерживают точно или приблизительно от 6,9 до 7,3. В одном варианте культуру поддерживают при температуре, равной или приблизительно составляющей от 35 до 37°C. В конкретном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно 36°C. В одном варианте температуру и/или рН культуры поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток. В одном варианте способ осуществляют в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования в хемостате. В другом конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования с перфузией. В одном варианте клеткой, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, является клетка млекопитающего. В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток CHO, линия клеток HEK293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

В другом варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мг/л никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ цинка. В родственном варианте культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мг/л никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка. В другом родственном варианте культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мг/л никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно от 2 до 12 мкМ цинка. В другом родственном варианте культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мг/л никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно от 5 до 12 мкМ цинка. В некоторых вариантах культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мг/л никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или больше цинка. В одном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно от 35 до 37°C. В конкретном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно 36°C. В одном варианте температуру и/или

pH культуры поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток. В одном варианте способ осуществляют в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования в хемостате. В другом конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования с перфузией. В одном варианте клеткой, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, является клетка млекопитающего. В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток CHO, линия клеток HEK293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

В другом варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 7 мг/л никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ цинка. В родственном варианте культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 7 мг/л никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка. В другом родственном варианте культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 7 мг/л никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно от 2 до 12 мкМ цинка. В еще одном родственном варианте культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 7 мг/л никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно от 5 до 12 мкМ цинка. В некоторых вариантах культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 7 мг/л никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или больше цинка. В одном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно от 35 до 37°C. В конкретном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно 36°C. В одном варианте температуру и/или pH культуры поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток. В одном варианте способ осуществляют в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования в хемостате. В другом конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования с перфузией. В одном варианте клеткой, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, является клетка млекопитающего. В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток CHO, линия клеток HEK293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

В другом варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно от 2 до 10 мг/л никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ цинка. В родственном варианте культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно от 2 до 10 мг/л никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка. В другом родственном варианте культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно от 2 до 10 мг/л никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно от 2 до 12 мкМ цинка. В еще одном родственном варианте культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно от 2 до 10 мг/л никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно от 5 до 12 мкМ цинка. В некоторых вариантах культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно от 2 до 10 мг/л никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или больше цинка. В одном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно от 35 до 37°C. В конкретном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно 36°C. В одном варианте температуру и/или pH культуры поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток. В одном варианте способ осуществляют в условиях непрерывного культивирования

ния или культивирования с подпиткой. В конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования в хемостате. В другом конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования с перфузией. В одном варианте клеткой, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, является клетка млекопитающего. В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток CHO, линия клеток НЕК293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

В другом варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мг/л или более высокие концентрации никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ цинка. В родственном варианте культуральная среда содержит точно или приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мг/л или более высокие концентрации никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка. В другом родственном варианте культуральная среда содержит точно или приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мг/л или более высокие концентрации никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно от 2 до 12 мкМ цинка. В еще одном родственном варианте культуральная среда содержит точно или приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мг/л или более высокие концентрации никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно от 5 до 12 мкМ цинка. В некоторых вариантах культуральная среда содержит точно или приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мг/л или более высокие концентрации никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или больше цинка. В одном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно от 35 до 37°C. В конкретном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно 36°C. В одном варианте температуру и/или pH культуры поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток. В одном варианте способ осуществляют в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования в хемостате. В другом конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования с перфузией. В одном варианте клеткой, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, является клетка млекопитающего. В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток CHO, линия клеток НЕК293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

В другом варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мг/л никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция. В родственном варианте культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мг/л никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно 1,5 мМ кальция. В другом родственном варианте культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мг/л никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно от 0,5 до 1,5 мМ кальция. В некоторых вариантах культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мг/л никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 мМ или больше кальция. В одном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно от 35 до 37°C. В конкретном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно 36°C. В одном варианте температуру и/или pH культуры поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток. В одном варианте способ осуществляют в условиях непрерывного культивирования

или культивирования с подпиткой. В конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования в хемостате. В другом конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования с перфузией. В одном варианте клеткой, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, является клетка млекопитающего. В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток CHO, линия клеток HEK293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

В другом варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 7 мг/л никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция. В родственном варианте культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 7 мг/л никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно 1,5 мМ кальция. В другом родственном варианте культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 7 мг/л никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно от 0,5 до 1,5 мМ кальция. В некоторых вариантах культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 7 мг/л никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 мМ или больше кальция. В одном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно от 35 до 37°C. В конкретном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно 36°C. В одном варианте температуру и/или рН культуры поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток. В одном варианте способ осуществляют в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования в хемостате. В другом конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования с перфузией. В одном варианте клеткой, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, является клетка млекопитающего. В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток CHO, линия клеток HEK293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

В другом варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно от 2 до 10 мг/л никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция. В родственном варианте культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно от 2 до 10 мг/л никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно 1,5 мМ кальция. В другом родственном варианте культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно от 2 до 10 мг/л никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно от 0,5 до 1,5 мМ кальция. В некоторых вариантах культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно от 2 до 10 мг/л никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 мМ или больше кальция. В одном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно от 35 до 37°C. В конкретном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно 36°C. В одном варианте температуру и/или рН культуры поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток. В одном варианте способ осуществляют в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования в хемостате. В другом конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования с перфузией. В одном варианте клеткой, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, явля-

ется клетка млекопитающего. В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток СНО, линия клеток НЕК293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

В другом варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мг/л или более высокие концентрации никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция. В родственном варианте культуральная среда содержит точно или приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мг/л или более высокие концентрации никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно 1,5 мМ кальция. В другом родственном варианте культуральная среда содержит точно или приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мг/л или более высокие концентрации никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно от 0,5 до 1,5 мМ кальция. В некоторых вариантах культуральная среда содержит точно или приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мг/л или более высокие концентрации никотинамида (витамина В3) и, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 мМ или больше кальция. В одном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно от 35 до 37°C. В конкретном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно 36°C. В одном варианте температуру и/или pH культуры поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток. В одном варианте способ осуществляют в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования в хемостате. В другом конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования с перфузией. В одном варианте клеткой, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, является клетка млекопитающего. В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток СНО, линия клеток НЕК293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

В одном варианте предлагается способ экспрессии белка дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей цинк, кальций и никотинамид (витамин В3). В некоторых вариантах цинк присутствует в культуральной среде в концентрации, составляющей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2, 5, от 2 до 12 мкМ, от 5 до 12 мкМ или по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или больше. В некоторых вариантах кальций присутствует в культуральной среде в концентрации, составляющей, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5, 1,5, от 0,5 до 1,5 или по меньшей мере 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 мМ или больше. В некоторых вариантах никотинамид (витамин В3) присутствует в культуральной среде в концентрации, составляющей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2, 7, от 2 до 7 мг/л или, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мг/л или больше.

Как специально описано в настоящей публикации и указано в виде вариантов 14-93 (табл. 3-6), предполагается любое сочетание концентраций трех компонентов (т.е. цинка, кальция и никотинамида (витамина В3)) для применения в способах согласно изобретению. В одном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно от 35 до 37°C. В конкретном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно 36°C. В одном варианте температуру и/или pH культуры поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток. В одном варианте способ осуществляют в условиях непрерывного культивирования или культивирования с подпиткой. В конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования в хемостате. В другом конкретном варианте условием непрерывного культивирования является условие культивирования с перфузией. В одном варианте клеткой, несущей нуклеиновую кислоту, коди-

рующую белок ADAMTS13, является клетка млекопитающего. В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток СНО, линия клеток НЕК293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин.

Таблица 3. Примеры вариантов культуральных сред, содержащих по меньшей мере 2 мг/л никотинамида (витамина В3), которые применимы для экспрессии белка ADAMTS13

	По меньшей мере 0,5 мМ кальция	По меньшей мере 1,5 мМ кальция	От 0,5 мМ до 1,5 мМ кальция	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 больше кальция
По меньшей мере 2 мкМ цинка	Вар. 14	Вар. 15	Вар. 16	Вар. 17
По меньшей мере 5 мкМ цинка	Вар. 18	Вар. 19	Вар. 20	Вар. 21
От 2 мкМ до 12 мкМ цинка	Вар. 22	Вар. 23	Вар. 24	Вар. 25
От 5 мкМ до 12 мкМ цинка	Вар. 26	Вар. 27	Вар. 28	Вар. 29
По меньшей мере 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 больше цинка	Вар. 30	Вар. 31	Вар. 32	Вар. 33

\*Вар. = вариант

Таблица 4. Примеры вариантов культуральных сред, содержащих по меньшей мере 7 мг/л никотинамида (витамина В3), которые применимы для экспрессии белка ADAMTS13

	По меньшей мере 0,5 мМ кальция	По меньшей мере 1,5 мМ кальция	От 0,5 мМ до 1,5 мМ кальция	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 больше кальция
По меньшей мере 2 мкМ цинка	Вар. 34	Вар. 35	Вар. 36	Вар. 37
По меньшей мере 5 мкМ цинка	Вар. 38	Вар. 39	Вар. 40	Вар. 41
От 2 мкМ до 12 мкМ цинка	Вар. 42	Вар. 43	Вар. 44	Вар. 45
От 5 мкМ до 12 мкМ цинка	Вар. 46	Вар. 47	Вар. 48	Вар. 49
По меньшей мере 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 больше цинка	Вар. 50	Вар. 51	Вар. 52	Вар. 53

\*Вар. = вариант

Таблица 5. Примеры вариантов культуральных сред, содержащих от 2 до 7 мг/л никотинамида (витамина В3), которые применимы для экспрессии белка ADAMTS13

	По меньшей мере 0,5 мМ кальция	По меньшей мере 1,5 мМ кальция	От 0,5 мМ до 1,5 мМ кальция	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 больше кальция
По меньшей мере 2 мкМ цинка	Вар. 54	Вар. 55	Вар. 56	Вар. 57
По меньшей мере 5 мкМ цинка	Вар. 58	Вар. 59	Вар. 60	Вар. 61
От 2 мкМ до 12 мкМ цинка	Вар. 62	Вар. 63	Вар. 64	Вар. 65
От 5 мкМ до 12 мкМ цинка	Вар. 66	Вар. 67	Вар. 68	Вар. 69
По меньшей мере 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 больше цинка	Вар. 70	Вар. 71	Вар. 72	Вар. 73

\*Вар. = вариант

Таблица 6. Примеры вариантов культуральных сред, содержащих по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мг/л или больше никотинамида (витамина В3), которые применимы для экспрессии белка ADAMTS13

	По меньшей мере 0,5 мМ кальция	По меньшей мере 1,5 мМ кальция	От 0,5 мМ до 1,5 мМ кальция	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 больше кальция
По меньшей мере 2 мкМ цинка	Вар. 74	Вар. 75	Вар. 76	Вар. 77
По меньшей мере 5 мкМ цинка	Вар. 78	Вар. 79	Вар. 80	Вар. 81
От 2 мкМ до 12 мкМ цинка	Вар. 82	Вар. 83	Вар. 84	Вар. 85
От 5 мкМ до 12 мкМ цинка	Вар. 86	Вар. 87	Вар. 88	Вар. 89
По меньшей мере 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 больше цинка	Вар. 90	Вар. 91	Вар. 92	Вар. 93

\*Вар. = вариант

#### В. Клетки-хозяева и векторы

Рекомбинантные белки ADAMTS могут быть получены в результате экспрессии в любой подходящей прокариотической или эукариотической системе хозяев. Примеры эукариотических клеток включают, без ограничения, клетки млекопитающих, такие как CHO, COS, HEK293, 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. В одном варианте белки ADAMTS могут быть экспрессированы в бактериальных клетках, дрожжевых клетках, клетках насекомых, клетках птиц,

клетках млекопитающих и тому подобное. Например, в линии клеток человека, линии клеток хомячка или линии клеток мыши. В одном конкретном варианте линией клеток является линия клеток CHO, ВНК или НЕК. В предпочтительном варианте линией клеток является линия клеток CHO.

В одном варианте клетка может представлять собой любую клетку млекопитающего, которую можно культивировать предпочтительно в условиях производственного процесса (т.е. по меньшей мере в 1 л), чтобы получить требуемый белок ADAMTS, такой как ADAMTS13. Примеры включают линию клеток почки обезьяны CV1, трансформированную SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линию клеток эмбриональной почки человека (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977)); клетки почки сирийского хомячка (ВНК, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомячка/-DHFR, такие как субклон DUKX-B11 (CHO, Uriaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Scd. 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 марьшшки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HeLa, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крысы Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); клетки опухоли молочной железы мыши (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 линия клеток является линией клеток грызунов, особенно линией клеток хомячка, такой как CHO или ВНК.

Широкое множество векторов можно использовать для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), и векторы могут быть выбраны из эукариотических и прокариотических экспрессирующих векторов. В некоторых вариантах предлагается плазмидный вектор для применения для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13). Как правило, плазмидные векторы, содержащие репликон и регуляторные последовательности, которые получены от вида, совместимого с клеткой-хозяином, используют применительно к таким хозяевам. Вектор может нести сайт репликации, а также маркирующие последовательности, которые способны обеспечивать фенотипическую селекцию трансформированных клеток. Плазида будет содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), функционально связанную с одной или несколькими регуляторными последовательностями, например, с промотором.

Предпочтительным способом получения подходящих клонов клеток CHO, экспрессирующих рекомбинантный белок ADAMTS, является следующий способ. Дефицитную по DHFR линию клеток CHO DUKX-B11 трансфицируют DHFR-экспрессирующим вектором, чтобы обеспечить возможность экспрессии соответствующего рекомбинантного белка, по существу, как описано в патенте США № 5250421 (Kaufman et al., Genetics Institute, Inc.). Селекцию осуществляют путем выращивания в среде, не содержащей гипоксантина/тимидина (HT), и осуществляют амплификацию соответствующей области, кодирующей экспрессию рекомбинантного белка ADAMTS и гена DHFR, размножая клетки в условиях возрастающих концентраций метотрексата. В соответствующих случаях линии клеток CHO могут быть адаптированы для роста в не содержащей сыворотки и/или белков среде, по существу, как описано в US 6100061 (Reiter et al., Immuno Aktiengesellschaft).

В другом предпочтительном варианте подходящие клетки НЕК293 получают в результате трансфекции конструкцией, содержащей селектируемый маркер гигромицина, и селекции трансформантов на основании резистентности к антибиотику.

Способность некоторых вирусов инфицировать клетки или проникать в клетки в результате опосредованного рецепторами эндоцитоза и стабильно и эффективно интегрироваться в геном клетки-хозяина и экспрессировать вирусные гены делает их привлекательными кандидатами для переноса чужеродных нуклеиновых кислот в клетки (например, клетки млекопитающих). Соответственно, в некоторых вариантах вирусный вектор используют для введения нуклеотидной последовательности, кодирующей белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в клетку-хозяина для экспрессии. Вирусный вектор будет содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), функционально связанную с одной или несколькими регуляторными последовательностями, например, с промотором. Альтернативно, вирусный вектор может не содержать регуляторную последовательность, и вместо нее управление экспрессией белка ADAMTS будет основано на регуляторной последовательности, имеющейся в клетке-хозяине. Не ограничивающие примеры вирусных векторов, которые можно использовать для доставки нуклеиновой кислоты, включают аденовирусные векторы, AAV-векторы и ретровирусные векторы.

В одном варианте аденовирусный экспрессирующий вектор включает такие конструкции, содержащие аденовирусные последовательности, достаточные для поддержания упаковки конструкции и, в конечном итоге, экспрессии конструкции ADAMTS, которая была в нем клонирована. Аденовирусные векторы обеспечивают возможность введения чужеродных последовательностей длиной до 7 т.н. (Grunhaus et al., *Seminar in Virology*, 200(2):535-546, 1992).

В другом варианте можно использовать аденоассоциированный вирус (AAV), чтобы ввести нуклеотидную последовательность, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в клетку-хозяина для экспрессии. Системы AAV были описаны ранее и, как правило, хорошо известны в данной области

(Kelleher and Vos, *Biotechniques*, 17(6):1110-7, 1994; Cotten et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 89(13):6094-6098, 1992; Curiel, *Nat Immun*, 13(2-3):141-64, 1994; Muzyczka, *Curr Top Microbiol Immunol*, 158:97-129, 1992). Подробности, касающиеся создания и применения векторов gAAV, описаны, например, в патентах США № 5139941 и 4797368, каждый из которых включен в настоящее описание путем ссылки в полном объеме для всех целей.

В одном варианте можно использовать ретровирусный экспрессирующий вектор для введения нуклеотидной последовательности, кодирующей белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в клетку-хозяина для экспрессии. Такие системы были описаны ранее и, как правило, хорошо известны в данной области (Mann et al., *Cell*, 33:153-159, 1983; Nicolas and Rubinstein, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 494-513, 1988; Temin, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati (ed.), New York: Plenum Press, pp. 149-188, 1986). В конкретном варианте ретровирусным вектором является 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).

Не ограничивающие примеры векторов для прокариотической экспрессии включают плазмиды, такие как pRSET, pET, pBAD и т.д., причем промоторы, используемые в прокариотических экспрессирующих векторах, включают lac, trc, trp, gcsA, araBAD и т.д. Примеры векторов для эукариотической экспрессии включают: (i) в случае экспрессии в дрожжах такие векторы, как pAO, pPIC, pYES, pMET, в которых использованы такие промоторы, как AOX1, GAP, GAL1, AUG1 и т.д.; (ii) в случае экспрессии в клетках насекомых такие векторы, как pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC и т.д., в которых использованы такие промоторы, как PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh и т.д., и (iii) в случае экспрессии в клетках млекопитающих такие векторы, как pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, pBPV и т.д., и векторы, полученные из вирусных систем, таких как вирус осповакцины, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса, ретровирусы и т.д., с использованием таких промоторов, как CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV и  $\beta$ -актина.

В некоторых вариантах способы культивирования клеток согласно изобретению могут включать использование микроносителя. Настоящее изобретение наряду с другими аспектами относится к способам крупномасштабной экспрессии белков ADAMTS. В некоторых вариантах культивирование клеток может быть осуществлено в больших биореакторах в условиях, подходящих для обеспечения площади поверхности для специфичного культивирования в больших объемах, чтобы получить высокие плотности клеток и высокую экспрессию белка. Одним из способов обеспечения таких условий роста является использование микроносителей для культуры клеток в биореакторах с механическим перемешиванием. В другом варианте такие требования роста удовлетворяются благодаря использованию суспензионной культуры клеток.

#### С. Способы культивирования

В некоторых вариантах способы согласно настоящему изобретению могут включать использование системы культивирования клеток, функционирующей в периодическом или непрерывном режиме работы. Например, когда используют периодические культуры клеток, они могут функционировать в режиме получения единичных партий, режиме с подпиткой или режиме получения множества партий. Подобным образом, непрерывное культивирование клеток может быть осуществлено, например, в режиме перфузии, турбидостатном или хеостатном режиме. Периодическое и непрерывное культивирование клеток может быть осуществлено либо в условиях поддержания суспензии или в условиях прикрепленных клеток. В случае культивирования в условиях суспензии клетки будут свободно суспендированы и перемешаны в культуральной среде. Альтернативно, в условиях прикрепления клетки будут связаны с твердой фазой, например, микроносителем, пористым микроносителем, дисковидным носителем, керамическим картриджем, полым волокном, плоским листом, гелевым матриксом и тому подобное.

Периодическое культивирование обычно является крупномасштабным культивированием, при котором инокулят клеток культивируют до максимальной плотности в реакторе или ферментере и собирают и обрабатывают в виде одной партии. Культура с подпиткой обычно представляет собой периодическую культуру, которую дополняют либо свежими питательными веществами (например, ограничивающими рост субстратами), либо добавками (например, предшественниками продуктов). Раствор для подпитки обычно является высококонцентрированным, чтобы избежать разбавления содержимого биореактора. При культивировании с многократным получением партий клетки помещают в культуральную среду и выращивают до требуемой плотности клеток. Затем, чтобы избежать наступления фазы снижения и гибели клеток, культуру разбавляют полной ростовой средой перед достижением максимальной концентрации клеток. Количество и частота разбавления широко варьируют и зависят от параметров роста линии клеток и возможностей способа культивирования. Процесс можно повторять столько, сколько требуется, и если клетки и среду не удаляют при субкультивировании, то объем культуры будет периодически увеличиваться при осуществлении каждого разбавления. С возрастающим объемом можно справиться при наличии реактора достаточного размера, позволяющего производить разбавления в сосуде, или посредством разделения разбавленной культуры на несколько сосудов. Целесообразность такого типа культивирования заключается в поддержании клеток в состоянии экспоненциального роста. Серийное суб-

культивирование отличается тем, что объем культуры всегда периодически возрастает, возможны многократные сборы клеток, клетки продолжают расти и процесс может продолжаться столько, сколько требуется. В некоторых вариантах белок ADAMTS (например, ADAMTS13) может быть извлечен после сбора супернатанта периодической культуры.

Непрерывная культура может быть суспензионной культурой, в которую непрерывно поступают питательные вещества благодаря подаче свежей среды, при этом объем культуры обычно поддерживается постоянным посредством одновременного удаления израсходованной среды. В способах с использованием хемостата и турбидостата извлеченная среда содержит клетки. Таким образом, клетки, остающиеся в сосуде для культивирования клеток, должны расти, чтобы поддерживать стационарное состояние. В хемостатном способе скорость роста обычно контролируют, регулируя скорость разведения, т.е. скорость, с которой добавляют свежую среду. Скорость роста клеток в культуре можно регулировать, например, на уровне субмаксимальной скорости роста, за счет изменения скорости разбавления. Напротив, в случае турбидостатного способа скорость разбавления устанавливают так, чтобы обеспечить максимальную скорость роста, которую клетки могут достигать в данных рабочих условиях, таких как pH и температура.

В случае культивирования с перфузией извлекаемая среда лишена клеток, которые остаются в сосуде для культивирования, например, в результате фильтрации или способов центрифугирования, которые приводят к возвращению клеток в культуру. Однако обычно мембраны, используемые для фильтрации, не удерживают 100% клеток, и поэтому часть клеток удаляется при извлечении среды. Это может быть не критичным для функционирования перфузионных культур при высоких скоростях роста, поскольку основная часть клеток остается в сосуде для культивирования.

Систему реактора с механическим перемешиванием можно использовать для периодического и непрерывного культивирования клеток, осуществляемого в режимах культивирования в суспензии или в прикрепленном состоянии. Обычно система реактора с механическим перемешиванием может функционировать в виде любого обычного реактора с механическим перемешиванием с любым типом мешалки, таким как мешалка Раштона, гидрокрыло, мешалка с наклонными лопастями или в виде гребного пропеллера.

Способы согласно изобретению могут включать использование культивирования клеток с подпиткой или непрерывное культивирование клеток, такое как культивирование клеток с перфузией или хемостатное культивирование, для экспрессии белка ADAMTS. В некоторых вариантах было обнаружено, что среды для культивирования с подпиткой, дополненные цинком в концентрациях, составляющих по меньшей мере приблизительно до 12 мкМ, обеспечивали экспрессию белка ADAMTS с повышенными удельными активностями (табл. 20). Причем в случае культур с подпиткой, дополненных цинком в конечной концентрации 12 мкМ, характерные скорости роста клеток и общая активность не изменялись, тогда как удельные активности экспрессированных белков ADAMTS13 продолжали увеличиваться. Полученные данные отличались от результатов, которые наблюдали в экспериментах с использованием культивирования клеток в хемостате. В таких экспериментах дополнение культуральной среды цинком в конечной концентрации 5 мкМ приводило к повышению удельной активности ADAMTS13 в супернатанте (табл. 21). Однако при более высоких уровнях добавок, 8,5 и 12 мкМ, характерные скорости роста клеток и общие выходы белка ADAMTS13 снижались, хотя удельная активность ADAMTS13 в супернатанте культуры оставалась высокой.

Соответственно, в одном варианте способы согласно изобретению включают использование культивирования клеток с подпиткой средой, содержащей цинк в концентрации, составляющей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ, точно или приблизительно от 2 до 12 мкМ, точно или приблизительно от 2 до 5 мкМ, точно или приблизительно от 5 до 12 мкМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или больше цинка. В некоторых вариантах концентрация цинка может составлять по меньшей мере приблизительно от 5 мкМ до по меньшей мере приблизительно 12 мкМ. В некоторых вариантах среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную среду.

#### 1. Непрерывная культура

Преимущественно настоящее изобретение относится к способам экспрессии белка ADAMTS, например ADAMTS13, с высокой удельной активностью в непрерывной культуре. Такие способы обеспечивают возможность длительной экспрессии и очистки белков ADAMTS из одной культуры в течение длительных периодов времени. В частности, было обнаружено, что высокие уровни экспрессии и удельной активности белка ADAMTS13 можно поддерживать по меньшей мере в течение 53 дней в 10-литровом хемостатном биореакторе в условиях, предлагаемых в настоящем изобретении (пример 3, см. табл. 15). В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

Соответственно, в одном варианте настоящее изобретение относится к способам экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13) с высокой специфичностью в течение длительного периода времени. В некоторых вариантах культуру поддерживают в течение, по меньшей мере, точно или приблизительно 7 суток или, по меньшей мере, точно или приблизительно в течение 14, 21, 28 суток, или, по меньшей

мере, точно или приблизительно в течение 5, 6, 7 недель, или, по меньшей мере, точно или приблизительно в течение 2 месяцев или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 месяцев или дольше. В некоторых таких вариантах уровень экспрессии, активности или удельной активности общего белка ADAMTS поддерживают в культуре в течение длительного периода времени. В других вариантах характерную скорость роста, плотность клеток и тому подобное поддерживают в культуре в течение длительного периода времени. В некоторых вариантах культуральная среда может быть дополнена по меньшей мере одним компонентом из кальция, цинка или никотинамида (витамина B3), например, в концентрации, соответствующей любому из вариантов 1-149 (табл. 2-9). В одном конкретном варианте способ включает использование культивирования клеток в хемостате. В другом варианте способ включает использование культивирования клеток в турбидостате. В еще одном варианте способ включает использование культивирования клеток с перфузией. В некоторых вариантах среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную среду. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В одном варианте методики непрерывного культивирования клеток можно использовать для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13) в культуре клеток, содержащей цинк, кальций и/или никотинамид (витамин B3) в концентрации согласно любому из вариантов 1-149 (табл. 2-9), в течение по меньшей мере 7 суток. В другом варианте методики непрерывного культивирования клеток можно использовать для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13) в культуре клеток, содержащей цинк, кальций и/или никотинамид (витамин B3) в концентрации согласно любому из вариантов 1-149 (табл. 2-9), в течение по меньшей мере 14 суток. В другом варианте методики непрерывного культивирования клеток можно использовать для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13) в культуре клеток, содержащей цинк, кальций и/или никотинамид (витамин B3) в концентрации согласно любому из вариантов 1-149 (табл. 2-9), в течение по меньшей мере 21 суток. В другом варианте методики непрерывного культивирования клеток можно использовать для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13) в культуре клеток, содержащей цинк, кальций и/или никотинамид (витамин B3) в концентрации согласно любому из вариантов 1-149 (табл. 2-9), в течение по меньшей мере 1 месяца. В другом варианте методики непрерывного культивирования клеток можно использовать для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13) в культуре клеток, содержащей цинк, кальций и/или никотинамид (витамин B3) в концентрации согласно любому из вариантов 1-149 (табл. 2-9), в течение по меньшей мере 2 месяцев. В другом варианте методики непрерывного культивирования клеток можно использовать для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13) в культуре клеток, содержащей цинк, кальций и/или никотинамид (витамин B3) в концентрации согласно любому из вариантов 1-149 (табл. 2-9), в течение по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или больше месяцев. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В некоторых вариантах способы экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13) могут включать использование непрерывного культивирования клеток в среде, содержащей цинк в концентрации, составляющей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ цинка, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка, точно или приблизительно от 2 до 12 мкМ цинка, точно или приблизительно от 2 до 5 мкМ цинка, точно или приблизительно от 3 до 5 мкМ цинка, точно или приблизительно от 5 до 12 мкМ цинка или, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или больше цинка, в течение по меньшей мере 7 суток. В одном конкретном варианте способ включает использование культивирования клеток в хемостате. В другом варианте способ включает использование культивирования клеток в турбидостате. В еще одном варианте способ включает использование культивирования клеток с перфузией. В некоторых вариантах среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную среду. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В одном варианте способ экспрессии белка ADAMTS включает культивирование в условиях непрерывной культуры клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ цинка, в течение по меньшей мере 7 суток. В других вариантах культуральная среда будет содержать по меньшей мере приблизительно 3 мкМ цинка. В другом варианте культуральная среда будет содержать по меньшей мере приблизительно 5 мкМ цинка. В другом варианте культуральная среда будет содержать точно или приблизительно от 2 до 5 мкМ цинка. В другом варианте культуральная среда будет содержать точно или приблизительно от 3 до 5 мкМ цинка. В другом варианте культуральная среда будет содержать точно или приблизительно от 2 до 12 мкМ цинка. В другом варианте культуральная среда будет содержать точно или приблизительно от 3 до 12 мкМ цинка. В другом варианте культуральная среда будет содержать точно или приблизительно от 5 до 12 мкМ цинка. В другом варианте культуральная среда будет содержать, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или больше цинка. В некоторых вариантах культуру поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток или по меньшей мере 14, 21, 28 суток, или по меньшей мере 5, 6, 7 недель, или по меньшей мере 2 месяцев, или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 месяцев или дольше. В одном конкретном варианте способ включает использование культивирования клеток в хемостате. В другом вари-

анте способ включает использование культивирования клеток в турбидостате. В еще одном варианте способ включает использование культивирования клеток с перфузией. В некоторых вариантах среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную среду. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В одном варианте способ экспрессии белка ADAMTS включает культивирование в условиях непрерывной культуры клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция, в течение по меньшей мере 7 суток. В других вариантах культуральная среда будет содержать по меньшей мере приблизительно 1,0 мМ кальция. В другом варианте культуральная среда будет содержать по меньшей мере приблизительно 1,5 мМ кальция. В другом варианте культуральная среда будет содержать точно или приблизительно от 0,5 до 1,5 мМ кальция. В другом варианте культуральная среда будет содержать точно или приблизительно от 1,0 до 1,5 мМ кальция. В другом варианте культуральная среда будет содержать, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 мМ или больше кальция. В некоторых вариантах культуру поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток или по меньшей мере 14, 21, 28 суток, или по меньшей мере 5, 6, 7 недель, или по меньшей мере 2 месяцев, или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 месяцев или дольше. В одном конкретном варианте способ включает использование культивирования клеток в хемостате. В другом варианте способ включает использование культивирования клеток в турбидостате. В еще одном варианте способ включает использование культивирования клеток с перфузией. В некоторых вариантах среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную среду. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В одном варианте способ экспрессии белка ADAMTS включает культивирование в условиях непрерывной культуры клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мг/л никотинамида (витамина В3), в течение по меньшей мере 7 суток. В других вариантах культуральная среда будет содержать по меньшей мере приблизительно 5 мг/л никотинамида (витамина В3). В другом варианте культуральная среда будет содержать по меньшей мере приблизительно 7 мг/л никотинамида (витамина В3). В другом варианте культуральная среда будет содержать точно или приблизительно от 2 до 7 мг/л никотинамида (витамина В3). В другом варианте культуральная среда будет содержать точно или приблизительно от 5 до 7 мг/л никотинамида (витамина В3). В другом варианте культуральная среда будет содержать, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мг/л или больше никотинамида (витамина В3). В некоторых вариантах культуру поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток или по меньшей мере 14, 21, 28 суток, или по меньшей мере 5, 6, 7 недель, или по меньшей мере 2 месяцев, или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 месяцев или дольше. В одном конкретном варианте способ включает использование культивирования клеток в хемостате. В другом варианте способ включает использование культивирования клеток в турбидостате. В еще одном варианте способ включает использование культивирования клеток с перфузией. В некоторых вариантах среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную среду. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В одном варианте способ экспрессии белка ADAMTS включает культивирование в условиях непрерывной культуры клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в культуральной среде, дополненной и цинком и кальцием, в течение по меньшей мере 7 суток. В некоторых вариантах концентрации цинка и кальция могут быть любыми, выбранными из концентраций, описанных в настоящей публикации. В некоторых вариантах концентрации цинка и кальция будут соответствовать одному из вариантов 94-113 (табл. 7). В некоторых вариантах культуру поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток или по меньшей мере 14, 21, 28 суток, или по меньшей мере 5, 6, 7 недель, или по меньшей мере 2 месяцев, или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 месяцев или дольше. В одном конкретном варианте способ включает использование культивирования клеток в хемостате. В другом варианте способ включает использование культивирования клеток в турбидостате. В еще одном варианте способ включает использование культивирования клеток с перфузией. В некоторых вариантах среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную среду. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В одном варианте способ экспрессии белка ADAMTS включает культивирование в условиях непрерывной культуры клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в культуральной среде, дополненной и цинком и никотинамидом (витамином В3), в течение по меньшей мере 7 суток. В некоторых вариантах концентрации цинка и никотинамида (витамина В3) могут быть любыми, выбранными из концентраций, описанных в настоящей публикации. В некоторых вариантах концентрации цинка и никотинамида (витамина В3) будут соответствовать одному из вариантов 114-133 (табл. 8). В некоторых вариантах культуру поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток или по меньшей мере 14, 21, 28 суток, или по меньшей мере 5, 6, 7 недель, или по меньшей мере 2

месяцев, или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 месяцев или дольше. В одном конкретном варианте способ включает использование культивирования клеток в хемостате. В другом варианте способ включает использование культивирования клеток в турбидостате. В еще одном варианте способ включает использование культивирования клеток с перфузией. В некоторых вариантах среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную среду. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В одном варианте способ экспрессии белка ADAMTS включает культивирование в условиях непрерывной культуры клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в культуральной среде, дополненной и кальцием и никотиномидом (витамином B3), в течение по меньшей мере 7 суток. В некоторых вариантах концентрации кальция и никотиномидом (витамина B3) могут быть любыми, выбранными из концентраций, описанных в настоящей публикации. В некоторых вариантах концентрации кальция и никотиномидом (витамина B3) будут соответствовать одному из вариантов 134-149 (табл. 9). В некоторых вариантах культуру поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток или по меньшей мере 14, 21, 28 суток, или по меньшей мере 5, 6, 7 недель, или по меньшей мере 2 месяцев, или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 месяцев или дольше. В одном конкретном варианте способ включает использование культивирования клеток в хемостате. В другом варианте способ включает использование культивирования клеток в турбидостате. В еще одном варианте способ включает использование культивирования клеток с перфузией. В некоторых вариантах среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную среду. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В одном варианте способ экспрессии белка ADAMTS включает культивирование в условиях непрерывной культуры клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в культуральной среде, дополненной цинком, кальцием и никотиномидом (витамином B3), в течение по меньшей мере 7 суток. В некоторых вариантах концентрации цинка, кальция и никотиномидом (витамина B3) могут быть любыми, выбранными из концентраций, описанных в настоящей публикации. В некоторых вариантах концентрации цинка, кальция и никотиномидом (витамина B3) будут соответствовать одному из вариантов 14-93 (табл. 3-6). В некоторых вариантах культуру поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток или по меньшей мере 14, 21, 28 суток, или по меньшей мере 5, 6, 7 недель, или по меньшей мере 2 месяцев, или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 месяцев или дольше. В одном конкретном варианте способ включает использование культивирования клеток в хемостате. В другом варианте способ включает использование культивирования клеток в турбидостате. В еще одном варианте способ включает использование культивирования клеток с перфузией. В некоторых вариантах среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную среду. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В одном варианте культуру поддерживают при плотности клеток, составляющей приблизительно от  $0,5 \times 10^6$  до  $4 \times 10^7$  клеток/мл, в течение длительного периода времени. В других вариантах поддерживают плотность клеток, соответствующую концентрации приблизительно от  $1,0 \times 10^6$  до приблизительно  $1,0 \times 10^7$  клеток/мл, в течение длительного периода времени. В других вариантах поддерживают плотность клеток, соответствующую концентрации приблизительно от  $1,0 \times 10^6$  до приблизительно  $4,0 \times 10^6$  клеток/мл, в течение длительного периода времени. В других вариантах поддерживают плотность клеток, соответствующую концентрации приблизительно от  $1,0 \times 10^6$  до приблизительно  $4,0 \times 10^6$  клеток/мл, в течение длительного периода времени. В следующих вариантах можно поддерживать плотность, соответствующую концентрации приблизительно от  $2,0 \times 10^6$  до приблизительно  $4,0 \times 10^6$  или приблизительно от  $1,0 \times 10^6$  до приблизительно  $2,5 \times 10^6$ , или приблизительно от  $1,5 \times 10^6$  до приблизительно  $3,5 \times 10^6$ , или в любом другом сходном диапазоне, в течение длительного периода времени. Плотность клеток, при которой поддерживают культуру клеток для получения рекомбинантного белка ADAMTS (например, ADAMTS13), будет зависеть от условий культивирования и среды, используемой для экспрессии белка. Специалист в данной области легко сможет определить оптимальную плотность клеток для культуры клеток, продуцирующих белок ADAMTS. В некоторых вариантах культуру поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток или по меньшей мере 14, 21, 28 суток, или по меньшей мере 5, 6, 7 недель, или по меньшей мере 2 месяцев, или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 месяцев или дольше. В одном конкретном варианте способ включает использование культивирования клеток в хемостате. В другом варианте способ включает использование культивирования клеток в турбидостате. В еще одном варианте способ включает использование культивирования клеток с перфузией. В некоторых вариантах среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную среду. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В других вариантах способы экспрессии ADAMTS13 обеспечивают получение, по меньшей мере, точно или приблизительно 500 единиц активности ADAMTS13 на литр культуры в сутки (500 единиц/л/сутки), например, единиц FRETS-VWF73-активности, с удельной активностью, составляющей, по меньшей мере, точно или приблизительно 500 единиц/мг A13. В других вариантах способы экспрессии ADAMTS13 обеспечивают получение, по меньшей мере, точно или приблизительно 600 единиц/л/сутки.

В других вариантах способы экспрессии ADAMTS13 обеспечивают получение, по меньшей мере, точно или приблизительно 700 единиц/л/сутки. В других вариантах способы экспрессии ADAMTS13 обеспечивают получение, по меньшей мере, точно или приблизительно 800 единиц/л/сутки. В других вариантах способы экспрессии ADAMTS13 обеспечивают получение, по меньшей мере, точно или приблизительно 900 единиц/л/сутки. В других вариантах способы экспрессии ADAMTS13 обеспечивают получение, по меньшей мере, точно или приблизительно 1000 единиц/л/сутки. В других вариантах способы экспрессии ADAMTS13 обеспечивают получение, по меньшей мере, точно или приблизительно 1100 единиц/л/сутки. В других вариантах способы экспрессии ADAMTS13 обеспечивают получение, по меньшей мере, точно или приблизительно 1200 единиц/л/сутки. В других вариантах способы экспрессии ADAMTS13 обеспечивают получение, по меньшей мере, точно или приблизительно 1300 единиц/л/сутки. В других вариантах способы экспрессии ADAMTS13 обеспечивают получение, по меньшей мере, точно или приблизительно 1400 единиц/л/сутки. В других вариантах способы экспрессии ADAMTS13 обеспечивают получение, по меньшей мере, точно или приблизительно 1500 единиц/л/сутки. В следующих вариантах способы экспрессии ADAMTS13 обеспечивают получение, по меньшей мере, точно или приблизительно 2000 единиц/л/сутки. В одном конкретном варианте способ включает использование культивирования клеток в хемостате. В другом варианте способ включает использование культивирования клеток в турбидостате. В еще одном варианте способ включает использование культивирования клеток с перфузией. В некоторых вариантах среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную среду. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В другом варианте способы обеспечивают возможность длительной экспрессии белка ADAMTS13 с высокими удельными активностями, например, с удельной активностью, составляющей по меньшей мере приблизительно 600 единиц/мг белка A13 или по меньшей мере приблизительно 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000 или больше единиц/мг белка A13, в течение длительного периода времени. В некоторых вариантах культуру поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток или по меньшей мере 14, 21, 28 суток, или по меньшей мере 5, 6, 7 недель, или по меньшей мере 2 месяцев, или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 месяцев или дольше. В одном конкретном варианте способ включает использование культивирования клеток в хемостате. В другом варианте способ включает использование культивирования клеток в турбидостате. В еще одном варианте способ включает использование культивирования клеток с перфузией. В некоторых вариантах среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную среду. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

## 2. Периодическая культура

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам экспрессии белка ADAMTS, например ADAMTS13, с высокой удельной активностью в периодической культуре. В некоторых вариантах культуральная среда может представлять собой среду, дополненную по меньшей мере одним компонентом из кальция, цинка или никотинамида (витамина B3), например, в концентрации согласно любому из вариантов 1-149 (табл. 2-9). В одном конкретном варианте способ включает использование культивирования клеток в виде отдельных партий. В другом варианте способ включает использование культивирования клеток с подпиткой. В еще одном варианте способ включает использование культивирования клеток с многократным получением партий. В некоторых вариантах культивирование можно осуществлять в виде периодических суспензионных культур. В других вариантах культивирование можно осуществлять в виде периодических прикрепленных культур. В некоторых вариантах среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную среду. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В одном варианте методику культивирования клеток с подпиткой или многократным получением партий можно использовать для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13) в культуре клеток, содержащей цинк, кальций и/или никотинамид (витамин B3) в концентрации согласно любому из вариантов 1-149 (табл. 2-9), в течение по меньшей мере 7 суток. В другом варианте методику культивирования клеток с подпиткой или многократным получением партий можно использовать для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13) в культуре клеток, содержащей цинк, кальций и/или никотинамид (витамин B3) в концентрации согласно любому из вариантов 1-149 (табл. 2-9), в течение по меньшей мере 14 суток. В другом варианте методику культивирования клеток с подпиткой или с многократным получением партий можно использовать для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13) в культуре клеток, содержащей цинк, кальций и/или никотинамид (витамин B3) в концентрации согласно любому из вариантов 1-149 (табл. 2-9), в течение по меньшей мере 21 суток. В другом варианте методику культивирования клеток с подпиткой или с многократным получением партий можно использовать для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13) в культуре клеток, содержащей цинк, кальций и/или никотинамид (витамин B3) в концен-

трации согласно любому из вариантов 1-149 (табл. 2-9), в течение по меньшей мере 2 месяцев. В другом варианте методику культивирования клеток с подпиткой или с многократным получением партий можно использовать для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13) в культуре клеток, содержащей цинк, кальций и/или никотинамид (витамин B3) в концентрации согласно любому из вариантов 1-149 (табл. 2-9), в течение по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или больше месяцев. В некоторых вариантах культивирование можно осуществлять в виде суспензионных периодических культур. В других вариантах культивирование можно осуществлять в виде прикрепленных периодических культур. В некоторых вариантах среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную среду. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В некоторых вариантах способы экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13) могут включать использование культивирования клеток с подпиткой или с многократным получением партий в среде, содержащей цинк в концентрации, составляющей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ цинка, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка, точно или приблизительно от 2 до 12 мкМ цинка, точно или приблизительно от 2 до 5 мкМ цинка, точно или приблизительно от 3 до 5 мкМ цинка, точно или приблизительно от 5 до 12 мкМ цинка, или, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или больше цинка, в течение по меньшей мере 7 суток. В некоторых вариантах культивирование можно осуществлять в виде суспензионных периодических культур. В других вариантах культивирование можно осуществлять в виде прикрепленных периодических культур. В некоторых вариантах среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную среду. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В одном варианте способ экспрессии белка ADAMTS включает культивирование в условиях культуры с подпиткой или культуры с получением многократных партий клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция, в течение по меньшей мере 7 суток. В других вариантах культуральная среда будет содержать по меньшей мере приблизительно 1,0 мМ кальция. В другом варианте культуральная среда будет содержать по меньшей мере приблизительно 1,5 мМ кальция. В другом варианте культуральная среда будет содержать точно или приблизительно от 0,5 до 1,5 мМ кальция. В другом варианте культуральная среда будет содержать точно или приблизительно от 1,0 до 1,5 мМ кальция.

В другом варианте культуральная среда будет содержать, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 мМ или больше кальция. В некоторых вариантах культуру поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток или по меньшей мере 14, 21, 28 суток, или по меньшей мере 5, 6, 7 недель, или по меньшей мере 2 месяцев, или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 месяцев или дольше. В некоторых вариантах культивирование можно осуществлять в виде суспензионных периодических культур. В других вариантах культивирование можно осуществлять в виде прикрепленных периодических культур. В некоторых вариантах среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную среду. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В одном варианте способ экспрессии белка ADAMTS включает культивирование в условиях культуры с подпиткой или культуры с многократным получением партий клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мг/л никотинамида (витамина B3), в течение по меньшей мере 7 суток. В других вариантах культуральная среда будет содержать по меньшей мере приблизительно 5 мг/л никотинамида (витамина B3). В другом варианте культуральная среда будет содержать по меньшей мере приблизительно 7 мг/л никотинамида (витамина B3). В другом варианте культуральная среда будет содержать точно или приблизительно от 2 до 7 мг/л никотинамида (витамина B3). В другом варианте культуральная среда будет содержать точно или приблизительно от 5 до 7 мг/л никотинамида (витамина B3). В другом варианте культуральная среда будет содержать, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мг/л или больше никотинамида (витамина B3). В некоторых вариантах культуру поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток или по меньшей мере 14, 21, 28 суток, или по меньшей мере 5, 6, 7 недель, или по меньшей мере 2 месяцев, или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 месяцев или дольше. В некоторых вариантах культивирование можно осуществлять в виде суспензионных периодических культур. В других вариантах культивирование можно осуществлять в виде прикрепленных периодических культур. В некоторых вариантах среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную среду. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В одном варианте способ экспрессии белка ADAMTS включает культивирование в условиях культуры с подпиткой или культуры с многократным получением партий клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в культуральной среде, дополненной и

цинком и кальцием, в течение по меньшей мере 7 суток. В некоторых вариантах концентрации цинка и кальция могут быть любыми, выбранными из концентраций, описанных в настоящей публикации. В некоторых вариантах концентрации цинка и кальция будут соответствовать одному из вариантов 94-113 (табл. 7). В некоторых вариантах культуру поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток или по меньшей мере 14, 21, 28 суток, или по меньшей мере 5, 6, 7 недель, или по меньшей мере 2 месяцев, или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 месяцев или дольше. В некоторых вариантах культивирование можно осуществлять в виде суспензионных периодических культур. В других вариантах культивирование можно осуществлять в виде прикрепленных периодических культур. В некоторых вариантах среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную среду. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В одном варианте способ экспрессии белка ADAMTS включает культивирование в условиях культуры с подпиткой или культуры с многократным получением партий клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в культуральной среде, дополненной и цинком и никотиномидом (витамином B3), в течение по меньшей мере 7 суток. В некоторых вариантах концентрации цинка и никотинамида (витамина B3) могут быть любыми, выбранными из концентраций, описанных в настоящей публикации. В некоторых вариантах концентрации цинка и никотинамида (витамина B3) будут соответствовать одному из вариантов 114-133 (табл. 8). В некоторых вариантах культуру поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток или по меньшей мере 14, 21, 28 суток, или по меньшей мере 5, 6, 7 недель, или по меньшей мере 2 месяцев, или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 месяцев или дольше. В некоторых вариантах культивирование можно осуществлять в виде суспензионных периодических культур. В других вариантах культивирование можно осуществлять в виде прикрепленных периодических культур. В некоторых вариантах среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную среду. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В одном варианте способ экспрессии белка ADAMTS включает культивирование в условиях культуры с подпиткой или культуры с многократным получением партий клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в культуральной среде, дополненной и кальцием и никотинамидом (витамином B3), в течение по меньшей мере 7 суток. В некоторых вариантах концентрации кальция и никотинамида (витамина B3) могут быть любыми, выбранными из концентраций, описанных в настоящей публикации. В некоторых вариантах концентрации кальция и никотинамида (витамина B3) будут соответствовать одному из вариантов 134-149 (табл. 9). В некоторых вариантах культуру поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток или по меньшей мере 14, 21, 28 суток, или по меньшей мере 5, 6, 7 недель, или по меньшей мере 2 месяцев, или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 месяцев или дольше. В некоторых вариантах культивирование можно осуществлять в виде суспензионных периодических культур. В других вариантах культивирование можно осуществлять в виде прикрепленных периодических культур. В некоторых вариантах среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную среду. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В одном варианте способ экспрессии белка ADAMTS включает культивирование в условиях культуры с подпиткой или культуры с многократным получением партий клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в культуральной среде, дополненной цинком, кальцием и никотинамидом (витамином B3), в течение по меньшей мере 7 суток. В некоторых вариантах концентрации цинка, кальция и никотинамида (витамина B3) могут быть любыми, выбранными из концентраций, описанных в настоящей публикации. В некоторых вариантах концентрации цинка, кальция и никотинамида (витамина B3) будут соответствовать одному из вариантов 14-93 (табл. 3-6). В некоторых вариантах культуру поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток или по меньшей мере 14, 21, 28 суток, или по меньшей мере 5, 6, 7 недель, или по меньшей мере 2 месяцев, или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 месяцев или дольше. В некоторых вариантах культивирование можно осуществлять в виде суспензионных периодических культур. В других вариантах культивирование можно осуществлять в виде прикрепленных периодических культур. В некоторых вариантах среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную среду. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В одном варианте культуру поддерживают при плотности клеток, составляющей приблизительно от  $0,5 \times 10^6$  до  $4 \times 10^7$  клеток/мл, в течение длительного периода времени. В других вариантах поддерживают плотность клеток, соответствующую концентрации приблизительно от  $1,0 \times 10^6$  до приблизительно  $1,0 \times 10^7$  клеток/мл, в течение длительного периода времени. В других вариантах поддерживают плотность клеток, соответствующую концентрации приблизительно от  $1,0 \times 10^6$  до приблизительно  $4,0 \times 10^6$  клеток/мл, в течение длительного периода времени. В других вариантах поддерживают плотность клеток, соответствующую концентрации приблизительно от  $1,0 \times 10^6$  до приблизительно  $4,0 \times 10^6$  клеток/мл, в течение длительного периода времени. В следующих вариантах можно поддерживать плотность клеток, соответствующую концентрации приблизительно от  $2,0 \times 10^6$  до приблизительно  $4,0 \times 10^6$  или приблизи-

тельно от  $1,0 \times 10^6$  до приблизительно  $2,5 \times 10^6$ , или приблизительно от  $1,5 \times 10^6$  до приблизительно  $3,5 \times 10^6$ , или в любом другом сходном диапазоне, в течение длительного периода времени. Плотность клеток, при которой поддерживают культуру клеток для получения рекомбинантного белка ADAMTS (например, ADAMTS13), будет зависеть от условий культивирования и среды, используемой для экспрессии белка. Специалист в данной области легко сможет определить оптимальную плотность клеток для культуры клеток, продуцирующих белок ADAMTS. В некоторых вариантах культуру поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток или по меньшей мере 14, 21, 28 суток, или по меньшей мере 5, 6, 7 недель, или по меньшей мере 2 месяцев, или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 месяцев или дольше. В некоторых вариантах культивирование можно осуществлять в виде суспензионных периодических культур. В других вариантах культивирование можно осуществлять в виде прикрепленных периодических культур. В некоторых вариантах среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную среду. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS 13.

В других вариантах способы экспрессии ADAMTS13 обеспечивают получение, по меньшей мере, точно или приблизительно 500 единиц активности ADAMTS13 на литр культуры в сутки (500 единиц/л/сутки), например, единиц FRETS-VWF73-активности, с удельной активностью, составляющей, по меньшей мере, точно или приблизительно 500 единиц/мг A13. В других вариантах способы экспрессии ADAMTS13 обеспечивают получение, по меньшей мере, точно или приблизительно 600 единиц/л/сутки. В других вариантах способы экспрессии ADAMTS13 обеспечивают получение, по меньшей мере, точно или приблизительно 700 единиц/л/сутки. В других вариантах способы экспрессии ADAMTS13 обеспечивают получение, по меньшей мере, точно или приблизительно 800 единиц/л/сутки. В других вариантах способы экспрессии ADAMTS13 обеспечивают получение, по меньшей мере, точно или приблизительно 900 единиц/л/сутки. В других вариантах способы экспрессии ADAMTS13 обеспечивают получение, по меньшей мере, точно или приблизительно 1000 единиц/л/сутки. В других вариантах способы экспрессии ADAMTS13 обеспечивают получение, по меньшей мере, точно или приблизительно 1100 единиц/л/сутки. В других вариантах способы экспрессии ADAMTS13 обеспечивают получение, по меньшей мере, точно или приблизительно 1200 единиц/л/сутки. В других вариантах способы экспрессии ADAMTS13 обеспечивают получение, по меньшей мере, точно или приблизительно 1300 единиц/л/сутки. В других вариантах способы экспрессии ADAMTS13 обеспечивают получение, по меньшей мере, точно или приблизительно 1400 единиц/л/сутки. В других вариантах способы экспрессии ADAMTS13 обеспечивают получение, по меньшей мере, точно или приблизительно 1500 единиц/л/сутки. В следующих вариантах способы экспрессии ADAMTS13 обеспечивают получение, по меньшей мере, точно или приблизительно 2000 единиц/л/сутки. В некоторых вариантах культивирование можно осуществлять в виде суспензионных периодических культур. В других вариантах культивирование можно осуществлять в виде прикрепленных периодических культур. В некоторых вариантах среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную среду. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В другом варианте способы обеспечивают длительную экспрессию белка ADAMTS13 с высокими удельными активностями, например удельной активностью, составляющей по меньшей мере приблизительно 600 единиц/мг белка A13 или по меньшей мере приблизительно 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000 или больше единиц/мг белка A13, в течение длительного периода времени. В некоторых вариантах культуру поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток или по меньшей мере 14, 21, 28 суток, или по меньшей мере 5, 6, 7 недель, или по меньшей мере 2 месяцев, или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 месяцев или дольше. В некоторых вариантах культивирование можно осуществлять в виде суспензионных периодических культур. В других вариантах культивирование можно осуществлять в виде прикрепленных периодических культур. В некоторых вариантах среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную среду. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS 13.

### 3. Условия культивирования

Неожиданно также было обнаружено, что жизнеспособность клеток и активность ADAMTS13 могут быть повышены за счет небольших изменений температуры и pH культуры клеток. Как можно видеть на фиг. 2, удельная активность экспрессированного ADAMTS13 сильно повышена, когда клетки, несущие нуклеотид, кодирующий белок ADAMTS13, культивируют при pH ниже приблизительно 7,30. Температура, хотя и в меньшей степени, также является фактором, который вносит вклад в удельную активность ADAMTS13 в таких исследованиях. Подобным образом, было обнаружено, что объемная продуктивность A13 (измеренная по FRETS-VWF73) в супернатантах культур, выращенных при pH приблизительно от 6,80 до приблизительно 7,3, была значительно увеличена по сравнению с уровнями pH выше или ниже указанного диапазона. На продуктивность ADAMTS13 также влияла температура культуры. Максимальная активность обнаружена в культурах, выращенных при температуре приблизительно от 34°C до приблизительно 37°C.

В других вариантах способы экспрессии белка ADAMTS включают стадию поддержания темпера-

туры культуральной среды на уровне приблизительно от 34 до приблизительно 37°C. В некоторых вариантах культуральную среду можно поддерживать при температуре 36,5°C или ниже, 36,0°C или ниже, 35,5°C или ниже или ниже 35,0°C. В конкретном варианте температуру поддерживают на уровне приблизительно 36°C. В конкретном варианте культуру поддерживают при сочетании температуры и диапазонов pH, указанных выше, например, 36,5°C или ниже и pH, например, 7,15 или меньше. В предпочтительном варианте культуру поддерживают при температуре 36,0°C и pH 7,10.

Соответственно, в некоторых вариантах способы экспрессии белка ADAMTS включают стадию поддержания pH культуральной среды на уровне pH приблизительно от 6,8 до 7,3. В некоторых вариантах pH может иметь значение приблизительно от 7,0 до приблизительно 7,25 или приблизительно от 7,05 до приблизительно 7,15. В некоторых вариантах pH можно поддерживать на уровне pH 7,20 или меньше, 7,15 или меньше, 7,10 или меньше или 7,05 или меньше. В одном конкретном варианте pH культуральной среды поддерживают на уровне pH приблизительно 7,1.

В одном варианте изобретение относится к способу экспрессии белка ADAMTS, который включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), при температуре, составляющей точно или приблизительно от 34°C до приблизительно 37°C, при pH точно или приблизительно от 6,8 до 7,3. В другом варианте температура культуры будет составлять точно или приблизительно от 35°C до приблизительно 37°C и pH будет составлять точно или приблизительно от 6,8 до 7,3. В другом варианте температура культуры будет составлять точно или приблизительно от 35,5°C до приблизительно 36,5°C и pH будет составлять точно или приблизительно от 6,8 до 7,3. В другом варианте температура культуры будет составлять точно или приблизительно 36°C и pH будет составлять точно или приблизительно от 6,8 до 7,3. В одном варианте культуральная среда будет дополнена цинком. В другом конкретном варианте культуральная среда будет дополнена кальцием. В другом конкретном варианте культуральная среда будет дополнена никотиномидом (витамином B3). В одном варианте культуральная среда будет дополнена цинком и кальцием. В одном варианте концентрации цинка и кальция будут соответствовать одному из вариантов 94-113 (табл. 7). В другом варианте культуральная среда будет дополнена цинком и никотиномидом (витамином B3). В одном варианте концентрации цинка и никотиномидом (витамина B3) будут соответствовать одному из вариантов 114-133 (табл. 8). В другом варианте культуральная среда будет дополнена кальцием и никотиномидом (витамином B3). В одном варианте концентрации кальция и никотиномидом (витамина B3) будут соответствовать одному из вариантов 134-149 (табл. 9). В еще одном варианте культуральная среда будет концентрирована цинком, кальцием и никотиномидом (витамином B3). В одном варианте концентрации цинка, кальция и никотиномидом (витамина B3) будут соответствовать одному из вариантов 14-93 (табл. 3-6).

В другом варианте изобретение относится к способу экспрессии белка ADAMTS, включающему культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), при температуре, составляющей точно или приблизительно от 34°C до приблизительно 37°C, при pH точно или приблизительно от 6,9 до 7,25. В другом варианте температура культуры будет составлять точно или приблизительно от 35°C до приблизительно 37°C и pH будет составлять точно или приблизительно от 6,9 до 7,25. В другом варианте температура культуры будет составлять точно или приблизительно от 35,5°C до приблизительно 36,5°C и pH будет составлять точно или приблизительно от 6,9 до 7,25. В другом варианте температура культуры будет составлять точно или приблизительно 36°C и pH будет составлять точно или приблизительно от 6,9 до 7,25. В одном варианте культуральная среда будет дополнена цинком. В другом конкретном варианте культуральная среда будет дополнена кальцием. В другом конкретном варианте культуральная среда будет дополнена никотиномидом (витамином B3). В одном варианте культуральная среда будет дополнена цинком и кальцием. В одном варианте концентрации цинка и кальция будут соответствовать одному из вариантов 94-113 (табл. 7). В другом варианте культуральная среда будет дополнена цинком и никотиномидом (витамином B3). В одном варианте концентрации цинка и никотиномидом (витамина B3) будут соответствовать одному из вариантов 114-133 (табл. 8). В другом варианте культуральная среда будет дополнена кальцием и никотиномидом (витамином B3). В одном варианте концентрации кальция и никотиномидом (витамина B3) будут соответствовать одному из вариантов 134-149 (табл. 9). В еще одном варианте культуральная среда будет концентрирована цинком, кальцием и никотиномидом (витамином B3). В одном варианте концентрации цинка, кальция и никотиномидом (витамина B3) будут соответствовать одному из вариантов 14-93 (табл. 3-6).

В другом варианте изобретение относится к способу экспрессии белка ADAMTS, включающему культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), при температуре, составляющей точно или приблизительно от 34°C до приблизительно 37°C, при pH точно или приблизительно от 7,0 до 7,20. В другом варианте температура культуры будет составлять точно или приблизительно от 35°C до приблизительно 37°C и pH будет составлять точно или приблизительно от 7,0 до 7,20. В другом варианте температура культуры будет составлять точно или приблизительно от 35,5°C до приблизительно 36,5°C и pH будет составлять точно или приблизительно от 7,0 до 7,20. В другом варианте температура культуры будет составлять точно или приблизительно 36°C и pH будет составлять точно или приблизительно от 7,0 до 7,20. В одном варианте культуральная среда будет дополнена цинком. В другом конкретном варианте культуральная среда будет дополнена кальци-

ем. В другом конкретном варианте культуральная среда будет дополнена никотинамидом (витамином В3). В одном варианте культуральная среда будет дополнена цинком и кальцием. В одном варианте концентрации цинка и кальция будут соответствовать одному из вариантов 94-113 (табл. 7). В другом варианте культуральная среда будет дополнена цинком и никотинамидом (витамином В3). В одном варианте концентрации цинка и никотинамида (витамина В3) будут соответствовать одному из вариантов 114-133 (табл. 8). В другом варианте культуральная среда будет дополнена кальцием и никотинамидом (витамином В3). В одном варианте концентрации кальция и никотинамида (витамина В3) будут соответствовать одному из вариантов 134-149 (табл. 9). В еще одном варианте культуральная среда будет концентрирована цинком, кальцием и никотинамидом (витамином В3). В одном варианте концентрации цинка, кальция и никотинамида (витамина В3) будут соответствовать одному из вариантов 14-93 (табл. 3-6).

Принцип выращивания клеток на микроносителях впервые описан van Wezel (van Wezel AL., Nature 1967 Oct. 7; 216(5110):64-5) и предусматривает прикрепление клеток на поверхности небольших твердых частиц, суспендируемых в среде для роста. Такие способы обеспечивают высокие отношения поверхности к объему и, следовательно, обеспечивают эффективное потребление питательных веществ. Кроме того, в случае экспрессии секретируемых белков в линиях эукариотических клеток, повышенное отношение поверхности к объему обеспечивает более высокие уровни секреции и, следовательно, более высокие выходы белка в супернатанте культуры. Наконец, такие способы позволяют легко увеличивать масштаб эукариотических экспрессирующих культур.

Клетки, экспрессирующие белок ADAMTS, могут быть связаны со сферическим или пористым микроносителем во время роста культуры клеток. Микроноситель может представлять собой микроноситель, выбранный из группы, состоящей из микроносителей на основе декстрана, коллагена, пластика, желатина и целлюлозы и других веществ, которые описаны Butler (1988, в Spier and Griffiths, Animal cell Biotechnology, 3:283-303). Таким образом, согласно одному варианту осуществления изобретения клетки, экспрессирующие белок ADAMTS, культивируют на сферических микроносителях. Согласно другому варианту осуществления изобретения клетки, экспрессирующие белок ADAMTS, культивируют на пористых микроносителях. Также можно выращивать клетки до биомассы на сферических микроносителях и субкультивировать клетки, когда они достигнут конечной биомассы в ферментере и перед получением экспрессируемого белка на пористом микроносителе или наоборот. Сферическими микроносителями являются носители, выбранные из группы, состоящей из носителей с гладкой поверхностью, таких как Cytodex™ I, Cytodex™ 2 и Cytodex™ 3 (GE Healthcare), и макропористых микроносителей, таких как Cytopore™ I, Cytopore™ 2, Cytoline™ 1 и Cytoline™ 2 (GE Healthcare).

#### IV. Культуральные среды

В одном аспекте настоящее изобретение относится к культуральным средам, которые применимы для экспрессии белков ADAMTS, обладающих высокими удельными активностями. Преимущественно было обнаружено, что при дополнении культуральной среды различными компонентами, такими как сочетания цинка, кальция и никотинамида (витамина В3), активности ферментов ADAMTS (например, ADAMTS13), экспрессированных в клетках, культивируемых в такой среде, значительно повышаются, причем ферменты экспрессируются на таких же высоких уровнях или даже более высоких уровнях, чем в случае клеток, культивируемых в средах без добавок.

Способы получения не содержащих животных белков и химически определенных культуральных сред известны в данной области, например, описаны в патентах США № 6171825 и 6936441, в WO 2007/077217 и в публикациях заявок на выдачу патентов США № 2008/0009040 и 2007/0212770, описания которых включены в настоящее описание путем ссылки в полном объеме для всех целей. В одном варианте культуральная среда, используемая в способах, описанных в настоящей публикации, представляет собой не содержащую животных белков или не содержащую олигопептидов среду. В некоторых вариантах культуральная среда может быть химически определенной. В некоторых вариантах культуральные среды могут содержать по меньшей мере один полиамин в концентрации приблизительно от 0,5 мг/л до приблизительно 10 мг/л.

Соответственно, в одном варианте предлагается культуральная среда, в которую добавлены дополнительно кальций, цинк и/или витамин В3. В некоторых вариантах среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную среду. В некоторых вариантах не содержащую животных белков или не содержащую олигопептидов среду получают согласно инструкциям, описанным в патентах США № 6171825 и 6936441, в WO 2007/077217 и заявках на выдачу патентов США № 2008/0009040 и 2007/0212770, содержание которых включено в настоящее описание путем ссылки в полном объеме для всех целей, и в среду добавляют дополнительно кальций, цинк и/или витамин В3. В конкретном варианте химически определенная культуральная среда может представлять собой среду, сходную с модифицированной по Дульбекко средой Игла (DMEM), в которую добавлены дополнительно кальций, цинк и/или витамин В3, чтобы повысить удельную активность белка ADAMTS, экспрессированного в клетке, культивируемой в среде. В следующих вариантах культуральная среда не содержит животных компонентов. В другом варианте культуральная среда содержит белок, например животный белок из сыворотки, такой как фетальная сыворотка теленка. В дру-

гом варианте культура содержит добавленные экзогенно рекомбинантные белки. В другом варианте белки получены от сертифицированного не содержащего патогенов животного.

В некоторых вариантах культуральная среда содержит по меньшей мере один полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда содержит по меньшей мере один полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 10 мг/л. В одном варианте культуральная среда содержит по меньшей мере один полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В некоторых вариантах полиамин выбран из группы, состоящей из орнитина, путресцина, спермина или спермидина, или тому подобное. В предпочтительном варианте полиамином является путресцин. В конкретном варианте культуральная среда содержит точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л путресцина.

В одном варианте предлагается культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), содержащая, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ цинка. В другом варианте культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка. В одном варианте культуральная среда содержит точно или приблизительно от 2 до 12 мкМ цинка. В другом варианте культуральная среда содержит точно или приблизительно от 5 до 12 мкМ цинка. В следующих вариантах культуральная среда может содержать, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ, или, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или больше цинка.

В общем, можно использовать любую соль цинка для добавления в среды согласно изобретению, не ограничивающие примеры приемлемых солей включают  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $ZnSO_3 \cdot 2H_2O$ ,  $(C_6H_5O_7)_2Zn_3 \cdot 2H_2O$ ,  $ZnBr_2$ ,  $ZnBr_2 \cdot 2H_2O$ ,  $ZnCl_2$ ,  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ,  $Zn(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$ ,  $(C_2H_3O_2)_2Zn \cdot 2H_2O$  и тому подобное. В некоторых вариантах используют фармацевтически приемлемую соль цинка для добавления в культуральные среды согласно изобретению. В других вариантах можно использовать препарат пептида или белка, содержащий цинк, например, препарат инсулина, для добавления в культуру, предлагаемую в настоящем изобретении.

В другом варианте предлагается культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), содержащая, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция. В другом варианте культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 1,5 мМ кальция. В одном варианте культуральная среда содержит точно или приблизительно от 0,5 до 1,5 мМ кальция. В следующих вариантах культуральная среда может содержать, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ, или, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 мМ или больше кальция.

В общем, может быть использована любая соль кальция для добавки в среды согласно изобретению, не ограничивающие примеры приемлемых солей включают  $CaCl_2$ ,  $CaFPO_3 \cdot 2H_2O$ ,  $CaI_2$ ,  $CaBr_2$ ,  $(C_2H_3O_2)_2Ca$ ,  $(CHO_2)_2Ca$ ,  $(C_6H_7O_6)_2Ca$ ,  $(C_6H_5O_7)_2Ca_3 \cdot 2H_2O$  и тому подобное. В некоторых вариантах используют фармацевтически приемлемую соль кальция для добавки в культуральные среды согласно изобретению.

В другом варианте предлагается культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), содержащая, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мг/л никотинамида (витамина В3). В другом варианте культуральная среда содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 7 мг/л никотинамида (витамина В3). В одном варианте культуральная среда содержит точно или приблизительно от 2 мг/л до 10 мг/л никотинамида (витамина В3). В других вариантах культуральная среда может содержать, по меньшей мере, точно или приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мг/л или более высокие концентрации никотинамида (витамина В3).

Преимущественно было обнаружено, что при дополнении культуральной среды и цинком и кальцием удельная активность белка ADAMTS13, экспрессированного в культуральной среде, значительно возрастает. Соответственно, в одном варианте культуральные среды, предлагаемые в настоящем изобретении для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), могут быть дополнены и цинком и кальцием. Например, культуральная среда может быть дополнена цинком и кальцием на уровнях, представленных в табл. 7, т.е. на уровне, соответствующем любому из вариантов 94-113.

Таблица 7. Примеры вариантов культуральных сред, дополненных цинком и кальцием, которые применимы для экспрессии белка ADAMTS13

	По меньшей мере 0,5 мМ кальция	По меньшей мере 1,5 мМ кальция	От 0,5 мМ до 1,5 мМ кальция	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 больше кальция
По меньшей мере 2 мкМ цинка	Вар. 94	Вар. 95	Вар. 96	Вар. 97
По меньшей мере 5 мкМ цинка	Вар. 98	Вар. 99	Вар. 100	Вар. 101
От 2 мкМ до 12 мкМ цинка	Вар. 102	Вар. 103	Вар. 104	Вар. 105
От 5 мкМ до 12 мкМ цинка	Вар. 106	Вар. 107	Вар. 108	Вар. 109
По меньшей мере 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 больше цинка	Вар. 110	Вар. 111	Вар. 112	Вар. 113

\*Вар. = вариант

Подобным образом, было обнаружено, что при дополнении культуральной среды и цинком и никотиномидом (витамином В3) удельная активность белка ADAMTS13, экспрессированного в культуральной среде, синергетически возрастала. Например, такой эффект можно видеть в примере 2 (сравн. день 11 в табл. 14 и дни 4 и 7 в табл. 13). Соответственно, в одном варианте культуральные среды, предлагаемые в настоящем изобретении для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), могут быть дополнены и цинком и никотиномидом (витамином В3). Например, культуральная среда может быть дополнена цинком и никотиномидом (витамином В3) на уровнях, указанных в табл. 8, т.е. на уровне, соответствующем любому из вариантов 114-133.

Таблица 8. Примеры вариантов культуральных сред, дополненных цинком и никотиномидом (витамином В3), которые применимы для экспрессии белка ADAMTS13

	По меньшей мере 2 мг/л никотинамида	По меньшей мере 7 мг/л никотинамида	От 2 мг/л до 7 мг/л никотинамида	По меньшей мере 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 больше никотинамида
По меньшей мере 2 мкМ цинка	Вар. 114	Вар. 115	Вар. 116	Вар. 117
По меньшей мере 5 мкМ цинка	Вар. 118	Вар. 119	Вар. 120	Вар. 121
От 2 мкМ до 12 мкМ цинка	Вар. 122	Вар. 123	Вар. 124	Вар. 125
От 5 мкМ до 12 мкМ цинка	Вар. 126	Вар. 127	Вар. 128	Вар. 129
По меньшей мере 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 больше цинка	Вар. 130	Вар. 131	Вар. 132	Вар. 133

\*Вар. = вариант

Преимущественно было обнаружено, что при дополнении культуральной среды и никотиномидом и кальцием удельная активность белка ADAMTS13, экспрессированного в культуральной среде, значительно возрастает. Соответственно, в одном варианте культуральные среды, предлагаемые в настоящем изобретении для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), могут быть дополнены и никотиномидом (витамином В3) и кальцием. Например, культуральная среда может быть дополнена никотиномидом (витамином В3) и кальцием на уровнях, представленных в табл. 9, т.е. на уровне, соответствующем

щем любому из вариантов 134-149.

Таблица 9. Примеры вариантов культуральных сред, дополненных никотиномидом (витамином В3) и кальцием, которые применимы для экспрессии белка ADAMTS13

	По меньшей мере 2 мг/л никотинамида	По меньшей мере 7 мг/л никотинамида	От 2 мг/л до 7 мг/л никотинамида	По меньшей мере 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 больше никотинамида
По меньшей мере 0,5 мМ кальция	Вар. 134	Вар. 135	Вар. 136	Вар. 137
По меньшей мере 1,5 мМ кальция	Вар. 138	Вар. 139	Вар. 140	Вар. 141
От 0,5 мМ до 1,5 мМ кальция	Вар. 142	Вар. 143	Вар. 144	Вар. 145
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 больше кальция	Вар. 146	Вар. 147	Вар. 148	Вар. 149

Вар. = вариант

В некоторых вариантах культуральная среда, предлагаемая в изобретении, может быть представлена в жидкой или сухой или порошкообразной форме. Среда может быть предварительно разделена на aliquоты в количестве, подходящем для одного применения, или представлена в большем количестве, которое можно использовать более чем для одной культуры клеток. Как правило, среда согласно изобретению будет представлена в стерильной форме. Соответственно, настоящее изобретение также относится к наборам для экспрессии или получения белка ADAMTS13, причем наборы содержат культуральную среду, подходящую для экспрессии белка ADAMTS, обладающего высокой удельной активностью.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к культуральным средам, применимым для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13) с высокими удельными активностями. В одном варианте культуральная среда содержит по меньшей мере приблизительно 2 мкМ цинка. В другом варианте культуральная среда содержит приблизительно от 2 до приблизительно 12 мкМ цинка. В еще одном варианте культуральная среда содержит по меньшей мере приблизительно 5 мкМ цинка. В одном варианте культуральная среда содержит приблизительно от 5 до приблизительно 12 мкМ цинка. В другом варианте культуральная среда содержит по меньшей мере приблизительно 0,5 мМ кальция. В еще одном варианте культуральная среда содержит приблизительно от 0,5 до приблизительно 1,5 мМ кальция. В одном варианте культуральная среда содержит по меньшей мере приблизительно 2 мкМ цинка и по меньшей мере приблизительно 0,5 мМ кальция.

В других вариантах было обнаружено, что добавление никотинамида (витамина В3) дополнительно усиливает экспрессию и повышает удельную активность белков ADAMTS в культуре клеток. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит по меньшей мере приблизительно 2 мг/л никотинамида (витамина В3). В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит по меньшей мере приблизительно 7 мг/л никотинамида (витамина В3). В еще одном варианте культуральная среда содержит приблизительно от 2 мг/л до приблизительно 10 мг/л никотинамида (витамина В3).

В некоторых вариантах культуральная среда представляет собой не содержащую животных белков культуральную среду. В другом варианте культуральная среда является химически определенной средой. В некоторых вариантах культуральная среда может содержать один или несколько полиаминов. В конкретном варианте полиамином является путресцин, например, в концентрации, составляющей по меньшей мере 0,5 мг/л. В конкретном варианте культуральная среда содержит приблизительно от 2 мг/л до приблизительно 8 мг/л путресцина.

#### 1. Не содержащие белков культуральные среды

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к культуральным средам для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), которые не содержат экзогенно добавленных белков. "Не содержащая белков культуральная среда" и родственные термины относятся к культуральной среде, в которой отсутствует белок, происходящий из источника, экзогенного для клеток или из других клеток, отличных от клеток в культуре, которые естественным образом выделяют белки во время роста. В одном

варианте предлагается культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), которая не содержит экзогенно добавленного белка (т.е. не содержит белков) и дополнена цинком, кальцием и/или никотинамидом (витамином B3). В некоторых вариантах не содержащая белков культуральная среда содержит полиамин. Например, в концентрации, составляющей по меньшей мере 2 мг/л или точно или приблизительно от 2 до 30 мг/л или точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин. Примеры не содержащих белков культуральных сред описаны в патентах США № 6171825 и 6936441, в WO 2007/077217 и в публикациях заявок на выдачу патентов США № 2008/0009040 и 2007/0212770, содержание которых включено в настоящее описание путем ссылки в полном объеме для всех целей.

В одном варианте предлагается не содержащая белков культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), содержащая, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ цинка, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка, точно или приблизительно от 2 до 12 мкМ цинка, или точно или приблизительно от 5 до 12 мкМ цинка. В других вариантах предлагается не содержащая белков культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), содержащая, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или больше цинка.

В другом варианте предлагается не содержащая белков культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), содержащая, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция, по меньшей мере, точно или приблизительно 1,5 мМ кальция, или точно или приблизительно от 0,5 до 1,5 мМ кальция. В следующих вариантах предлагается не содержащая белков культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), содержащая, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 мМ или больше кальция.

В еще одном варианте предлагается не содержащая белков культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), содержащая, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мг/л никотинамида (витамина B3), по меньшей мере, точно или приблизительно 7 мг/л никотинамида (витамина B3), или точно или приблизительно от 2 мг/л никотинамида (витамина B3). В следующих вариантах предлагается не содержащая белков культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), содержащая, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мг/л или больше никотинамида (витамина B3).

## 2. Не содержащие олигопептидов культуральные среды

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к культуральным средам для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), которые не содержат экзогенно добавляемых олигопептидов. В одном варианте предлагается культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), которая не содержит экзогенно добавляемых олигопептидов (т.е. не содержит полипептидов) и дополнена цинком, кальцием и/или никотинамидом (витамином B3). В некоторых вариантах не содержащая олигопептидов культуральная среда содержит полиамин. Например, в концентрации, составляющей по меньшей мере 2 мг/л или точно или приблизительно от 2 до 30 мг/л, или точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин. Примеры не содержащих олигопептидов культуральных сред описаны в патентах США № 6171825 и 6936441, в WO 2007/077217 и в заявках на выдачу патентов США № 2008/0009040 и 2007/0212770, содержание которых включено в настоящее описание путем ссылки в полном объеме для всех целей.

В одном варианте предлагается не содержащая олигопептидов культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), содержащая, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ цинка, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка, точно или приблизительно от 2 до 12 мкМ цинка, или точно или приблизительно от 5 до 12 мкМ цинка. В других вариантах предлагается не содержащая олигопептидов культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), содержащая, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или больше цинка.

В другом варианте предлагается не содержащая олигопептидов культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), содержащая, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция, по меньшей мере, точно или приблизительно 1,5 мМ кальция, или точно или приблизительно от 0,5 до 1,5 мМ кальция. В других вариантах предлагается не содержащая олигопептидов культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), содержащая, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 мМ или больше кальция.

В еще одном варианте предлагается не содержащая олигопептидов культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), содержащая, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мг/л никотинамида (витамина B3), по меньшей мере, точно или приблизительно 7 мг/л никотинамида (витамина B3), или точно или приблизительно от 2 мг/л никотинамида (витамина B3). В других вариантах предлагается не содержащая олигопептидов культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), содержащая, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6,

7, 8, 9, 10, 15, 20 мг/л или больше никотинамида (витамина В3).

### 3. Бессывороточные культуральные среды

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к культуральным средам для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), которая не содержит сыворотки. В одном варианте предлагается культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), которая не содержит экзогенно добавляемой сыворотки (т.е. бессывороточная среда) и дополнена цинком, кальцием и/или никотинамидом (витамином В3). В некоторых вариантах бессывороточная культуральная среда содержит полиамин. Например, в концентрации, составляющей по меньшей мере 2 мг/л или точно или приблизительно от 2 до 30 мг/л, или точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин. Примеры бессывороточных культуральных сред описаны в патентах США № 6171825 и 6936441, в WO 2007/077217 и в публикациях заявок на выдачу патентов США № 2008/0009040 и 2007/0212770, содержание которых включено в настоящее описание путем ссылки в полном объеме для всех целей. В одном варианте предлагается бессывороточная культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), содержащая, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ цинка, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка, точно или приблизительно от 2 до 12 мкМ цинка, или точно или приблизительно от 5 до 12 мкМ цинка. В других вариантах предлагается бессывороточная культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), содержащая, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или больше цинка.

В другом варианте предлагается бессывороточная культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), содержащая, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция, по меньшей мере, точно или приблизительно 1,5 мМ кальция, или точно или приблизительно от 0,5 до 1,5 мМ кальция. В других вариантах предлагается бессывороточная культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), содержащая, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 мМ или больше кальция.

В еще одном варианте предлагается бессывороточная культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), содержащая, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мг/л никотинамида (витамина В3), по меньшей мере, точно или приблизительно 7 мг/л никотинамида (витамина В3), или точно или приблизительно от 2 мг/л никотинамида (витамина В3). В других вариантах предлагается бессывороточная культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13) содержащая, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мг/л или больше никотинамида (витамина В3).

### 4. Культуральные среды, не содержащие животных белков

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к культуральным средам для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), которые не содержат животных белков. В одном варианте предлагается культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), которая не содержит экзогенно добавляемых животных белков или полипептидов (т.е. не содержит животных белков) и дополнена цинком, кальцием и/или никотинамидом (витамином В3). В некоторых вариантах не содержащая животных белков культуральная среда содержит полиамин. Например, в концентрации, составляющей по меньшей мере 2 мг/л или точно или приблизительно от 2 до 30 мг/л, или точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин. Примеры не содержащих животных белков культуральных сред описаны в патентах США № 6171825 и 6936441, в WO 2007/077217 и в публикациях заявок на выдачу патентов США № 2008/0009040 и 2007/0212770, содержание которых включено в настоящее описание путем ссылки в полном объеме для всех целей.

В одном варианте предлагается не содержащая животных белков культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), содержащая, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ цинка, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка, точно или приблизительно от 2 до 12 мкМ цинка, или точно или приблизительно от 5 до 12 мкМ цинка. В других вариантах предлагается не содержащая животных белков культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), содержащая, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или больше цинка.

В другом варианте предлагается не содержащая животных белков культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), содержащая, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция, по меньшей мере, точно или приблизительно 1,5 мМ кальция, или точно или приблизительно от 0,5 до 1,5 мМ кальция. В следующих вариантах предлагается не содержащая животных белков культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), содержащая, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 мМ или больше кальция.

В еще одном варианте предлагается не содержащая животных белков культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), содержащая, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мг/л никотинамида (витамина В3), по меньшей мере, точно или приблизительно 7 мг/л никоти-

намида (витамина B3), или точно или приблизительно от 2 мг/л никотинамида (витамина B3). В других вариантах предлагается не содержащая животных белков культуральная среда для экспрессии белка ADAMTS (например, ADAMTS13), содержащая, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 2 0 мг/л или больше никотинамида (витамина B3).

#### V. Очистка белков ADAMTS

ADAMTS13 секретируется в плазму *in vivo*, где он функционирует, регулируя свертывающую активность, посредством расщепления крупных мультимеров vWF. Способность клеток млекопитающих секретировать ADAMTS13 после экспрессии можно использовать при получении и очистке композиций ADAMTS13 в культуре клеток. Например, при экспрессии рекомбинантного ADAMTS13 в культуре клеток млекопитающих, композиции ADAMTS13 могут быть легко извлечены непосредственно из супернатанта культуры без необходимости в сборе и лизисе клеток. Это позволяет использовать такие методики, как непрерывное культивирование клеток (например, культивирование клеток с перфузией или культивирование клеток в хемостате), с получением больших количеств белка без многократных лаг-периодов и периодов восстановления культуры. В одном аспекте изобретения предлагаются способы очистки белков ADAMTS, обладающих высокой удельной активностью, из культуры клеток.

Соответственно, в одном варианте белки ADAMTS13 экспрессируют в культуре и извлекают непосредственно из супернатанта культуры. Таким образом, белки ADAMTS13 извлекают путем изъятия части культуры и очистки ADAMTS13 от других компонентов супернатанта. В общем, такой способ заключается в отделении любых клеток, которые извлечены вместе с супернатантом, с помощью фильтрации или центрифугирования, и в осуществлении одной или нескольких стадий очистки ADAMTS13 из супернатанта.

В публикации заявки на выдачу патента США № 2005/0266528 и в публикации Zheng с соавторами (2001, Blood, 98:1662-1666), содержание которых включено в настоящее описание путем ссылки в полном объеме для всех целей) предлагаются примеры способов очистки ADAMTS13. Очищенный ADAMTS13 может быть получен в виде препарата обычными способами и использован терапевтически, например, для лечения ТТР.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам получения композиции белка ADAMTS (например, композиции ADAMTS13). В первом варианте способ включает стадии: (a) культивирования клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS, в не содержащей животных белков культуральной среде; (b) извлечения фракции супернатанта из культуры; (c) осуществления стадии фильтрации или центрифугирования для удаления оставшихся клеток; (d) осуществления стадии ультрафильтрации для концентрирования белка ADAMTS; и (e) осуществления стадии диафильтрации с использованием буфера, содержащего по меньшей мере приблизительно 0,5 мкМ цинка и по меньшей мере приблизительно 0,1 мМ кальция; с получением, таким образом, композиции ADAMTS.

В некоторых вариантах стадия культивирования клетки включает периодическое культивирование клеток. В других вариантах стадия культивирования клетки включает непрерывное культивирование клеток.

В некоторых вариантах культуральная среда содержит кальций. В конкретном варианте культуральная среда содержит по меньшей мере 0,5 мМ кальция. В других вариантах культуральная среда содержит цинк. В конкретном варианте культуральная среда содержит по меньшей мере 2 мкМ цинка. В других вариантах культуральная среда содержит никотинамид (витамин B3). В конкретном варианте культуральная среда содержит по меньшей мере 2 мг/л никотинамида (витамина B3). В некоторых вариантах буфер для диафильтрации содержит по меньшей мере приблизительно 5 мкМ цинка и по меньшей мере приблизительно 2 мМ кальция.

В некоторых вариантах теряется менее чем приблизительно 20% удельной активности ADAMTS13, начиная с конца стадии (c) и до конца стадии (e). В других вариантах теряется менее чем приблизительно 10% удельной активности ADAMTS13, начиная с конца стадии (c) и до конца стадии (e). В других вариантах композиция ADAMTS13 обладает удельной активностью, составляющей по меньшей мере приблизительно 1000 единиц/мг. В другом варианте композиция ADAMTS13 обладает удельной активностью, составляющей по меньшей мере приблизительно 1500 единиц/мг.

#### A. Замена буфера

Обычно, при очистке секретируемого белка из супернатанта культуры первая стадия способа очистки заключается в замене культуральной среды забуференным раствором, который облегчает дальнейшую очистку представляющего интерес белка. Существует несколько возможных вариантов для замены культуральной среды на буфер, включая без ограничения диафильтрацию, диализ, способы замены буфера, гель-фильтрацию, хроматографию и тому подобное.

Было обнаружено, что композиции белка ADAMTS13 теряют значительную часть своей удельной активности во время таких стадий очистки, которые требуют введения новых буферов, например, при диафильтрации, диализе, замене буфера, хроматографии и подобных стадиях, независимо от продолжительности периода времени от сбора супернатанта из культуры до стадии очистки. Однако авторы настоящего изобретения преимущественно обнаружили, что при введении цинка и кальция в буфер, вводимый в систему, такую как система на стадии диафильтрации, диализа, замены буфера, гель-

фильтрации и хроматографии, такие высокие удельные активности композиции ADAMTS13 сохраняются. В качестве доказательства, в примере 6 показано, что диафильтрация композиции ADAMTS13 с использованием буфера, в котором отсутствуют кальций и цинк, приводит к потере в среднем почти 25% удельной активности композиции, тогда как включение кальция и цинка почти полностью предотвращает такую потерю (табл. 22). Соответственно, настоящее изобретение относится к способам снижения потери активности композиций белка ADAMTS после диафильтрации или подобных способов, например диализа, замены буфера, хроматографии, благодаря введению цинка и кальция в буферную систему.

В одном варианте предлагается способ очистки композиции белка ADAMTS (например, ADAMTS13), причем способ включает стадии: (а) культивирования клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в культуральной среде; (b) извлечения части супернатанта культуральной среды, содержащего белок ADAMTS (например, ADAMTS13); и (с) замены супернатанта культуральной среды буферным раствором, содержащим цинк и кальций, с получением, таким образом, композиции белка ADAMTS (например, ADAMTS13). В одном варианте культуральная среда содержит цинк, кальций и необязательно никотинамид (витамин В3). В предпочтительном варианте стадия культивирования клетки включает непрерывное культивирование (например, культивирование с перфузией или культивирование в хемостате). В другом предпочтительном варианте культуру поддерживают при температуре от 34 до 37°C. В еще одном предпочтительном варианте культуру поддерживают при рН от 6,9 до 7,2.

В одном конкретном варианте стадия замены супернатанта культуральной среды буферным раствором включает использование буфера, содержащего, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мкМ цинка. В другом варианте буфер содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка. В некоторых вариантах концентрация кальция может составлять по меньшей мере приблизительно 0,1, 0,3, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3, 5 мМ или больше кальция. В некоторых вариантах концентрация цинка может составлять по меньшей мере приблизительно 0,5, 1, 2, 3, 5, 10 мкМ или больше цинка. Как правило, любое сочетание концентраций, указанных выше, является подходящим для использования в способах согласно настоящему изобретению.

В одном варианте предлагается способ замены буфера в композиции белка ADAMTS (например, ADAMTS13) посредством осуществления замены буфера (например, диафильтрацией, диализом, гель-фильтрацией и т.д.) с использованием буфера, содержащего кальций и цинк. В одном конкретном варианте способ включает использование буфера, содержащего, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мкМ цинка. В другом варианте буфер содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 1 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно 1 мкМ цинка. В одном варианте буфер содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ цинка. В другом варианте буфер содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка. В следующих вариантах буфер содержит от 0,5 до 5 мМ кальция и от 0,5 до 5 мкМ цинка. В некоторых вариантах концентрация кальция может составлять по меньшей мере приблизительно 0,1, 0,3, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3, 5 мМ или больше кальция. В некоторых вариантах концентрация цинка может составлять по меньшей мере приблизительно 0,5, 1, 2, 3, 5, 10 мкМ или больше цинка. В некоторых вариантах собранный материал, бесклеточный супернатант или буфер для диафильтрации содержит сочетания кальция и цинка в указанных выше концентрациях.

В другом варианте предлагается способ стабилизации ферментативной активности белка ADAMTS (например, ADAMTS13) после экспрессии в культуре клеток, включающий добавление в содержащий клетки собранный материал, бесклеточный супернатант или буфер для диафильтрации, используемый для концентрирования или замены буфера в растворе ADAMTS, кальция и цинка. В одном конкретном варианте способ включает использование буфера, содержащего, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мкМ цинка. В другом варианте буфер содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка. В некоторых вариантах концентрация кальция может составлять по меньшей мере приблизительно 0,1, 0,3, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3, 5 мМ или больше кальция. В некоторых вариантах концентрация цинка может составлять по меньшей мере приблизительно 0,5, 1, 2, 3, 5, 10 мкМ или больше цинка. В некоторых вариантах собранный материал, бесклеточный супернатант или буфер для диафильтрации содержит сочетания кальция и цинка в указанных выше концентрациях.

В других вариантах способы, предлагаемые в настоящем изобретении, приводят к потере менее чем 15% удельной активности, имеющейся на любой отдельной стадии. В предпочтительном варианте способы, предлагаемые в настоящем изобретении, приводят к потере менее чем 10% удельной активности после любой отдельной стадии. В конкретном варианте менее чем 15% удельной активности, присутствующей в извлеченном супернатанте культуры, теряется во время начальной стадии замены буфера (например, во время диафильтрации или диализа). В предпочтительном варианте менее чем 10% удельной активности, присутствующей в извлеченном супернатанте культуры, теряется на начальной стадии замены буфера (например, во время диафильтрации или диализа).

### В. Хроматография

В некоторых вариантах композицию белка ADAMTS (например, ADAMTS13) дополнительно обогащают, осуществляя одну или несколько хроматографических стадий. В одном варианте предлагается способ осуществления обогащения композиции белка ADAMTS (например, ADAMTS13), причем способ включает стадии: (а) культивирования клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13); в культуральной среде; (b) извлечения части супернатанта культуральной среды, содержащего белок ADAMTS (например, ADAMTS13); (с) замены супернатанта культуральной среды забуференным раствором, содержащим цинк и кальций, с образованием первой композиции белка ADAMTS (например, ADAMTS13); и (d) дополнительного обогащения белка ADAMTS (например, ADAMTS13) путем осуществления хроматографической стадии с получением, таким образом, обогащенной композиции ADAMTS (например, ADAMTS13). В одном варианте культуральная среда содержит цинк, кальций и необязательно никотинамид (витамин В3). В предпочтительном варианте стадия культивирования клетки включает непрерывное культивирование (например, культивирование в перфузии) или культивирование в хеостате). В другом предпочтительном варианте культуру поддерживают при температуре от 34 до 37°C. В еще одном предпочтительном варианте культуру поддерживают при pH от 6,9 до 7,2.

В одном конкретном варианте стадия замены супернатанта культуральной среды забуференным раствором и/или хроматографическая стадия включает использование буфера, содержащего, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мкМ цинка. В предпочтительном варианте обе стадии включают использование буферов, содержащих, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мкМ цинка. В другом варианте буфер содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка. В некоторых вариантах концентрация кальция может составлять по меньшей мере приблизительно 0,1, 0,3, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3, 5 мМ или больше кальция. В некоторых вариантах концентрация цинка может составлять по меньшей мере приблизительно 0,5, 1, 2, 3, 5, 10 мкМ или больше цинка. Как правило, любое сочетание концентраций, указанных выше, является подходящим для использования в способах согласно настоящему изобретению.

В одном варианте предлагается способ сохранения удельной активности композиции белка ADAMTS (например, ADAMTS13) во время хроматографической стадии посредством добавления в буфер (буферы), используемый на хроматографической стадии, цинка и кальция. В одном конкретном варианте способ включает использование буфера, содержащего, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мкМ цинка. В другом варианте буфер содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка. В некоторых вариантах концентрация кальция может составлять по меньшей мере приблизительно 0,1, 0,3, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3, 5 мМ или больше кальция. В некоторых вариантах концентрация цинка может составлять по меньшей мере приблизительно 0,5, 1, 2, 3, 5, 10 мкМ или больше цинка. Как правило, любое сочетание концентраций, указанных выше, является подходящим для использования в способах согласно настоящему изобретению.

Не ограничивающие примеры способов хроматографии, которые можно использовать для очистки композиции белка ADAMTS (например, композиции ADAMTS13), включают анионообменную хроматографию (АЕС), катионообменную хроматографию (СЕС), хроматографию на основе гидрофобного обмена (НЕС), хроматографию на гидроксипатите (НАР), иммуноаффинную хроматографию, эксклюзионную хроматографию по размеру (т.е. гель-фильтрацию) или другую подходящую хроматографическую стадию. Хроматографические стадии могут быть осуществлены либо в режиме хроматографии в объеме партии, либо в режиме хроматографии на колонке. В некоторых вариантах буферы, используемые для осуществления любого из указанных способов хроматографии, будут содержать цинк и кальций. В одном конкретном варианте способ включает использование буфера, содержащего, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мкМ цинка. В другом варианте буфер содержит, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мМ кальция и, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка. В некоторых вариантах концентрация кальция может составлять по меньшей мере приблизительно 0,1, 0,3, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3, 5 мМ или больше кальция. В некоторых вариантах концентрация цинка может составлять по меньшей мере приблизительно 0,5, 1, 2, 3, 5, 10 мкМ или больше цинка. Как правило, любое сочетание концентраций, указанных выше, является подходящим для использования в способах согласно настоящему изобретению.

Любую подходящую анионообменную смолу можно использовать в способах, предлагаемых в настоящем изобретении. Не ограничивающие примеры анионообменных смол, подходящих для использования, включают смолы на основе диэтиламиноэтила (DEAE), четвертичного аминоэтила (QAE) и четвертичного аммония (Q).

Любую подходящую катионообменную смолу можно использовать в способах, предлагаемых в настоящем изобретении. Не ограничивающие примеры катионообменных смол, подходящих для использования, включают смолы на основе карбоксиметила (СМ), сульфопропила (SP), метилсульфоната (S).

Любую подходящую смолу на основе на гидроксипатита или другой формы кальция можно использовать в способах, предлагаемых в настоящем изобретении. Не ограничивающие примеры подходящих смол включают гидроксипатитные смолы, фторпатитные смолы, фторгидроксипатитные смолы и тому подобное.

Любую смолу, подходящую для хроматографии на основе гидрофобного взаимодействия, можно использовать в способах, предлагаемых в настоящем изобретении. Не ограничивающие примеры подходящих смол включают фенилсодержащие смолы, метилсодержащие смолы, бутилсодержащие смолы, октилсодержащие смолы и тому подобное.

В некоторых вариантах белок ADAMTS13 (например, ADAMTS13) может быть дополнительно обогащен путем осуществления иммуноаффинной хроматографии, например, с использованием смол, конъюгированных с антителом, аптамером или другой связывающей молекулой, высокоспецифичной по отношению к белку ADAMTS13 (например, ADAMTS13).

В одном варианте способ уменьшения потери активности ADAMTS приводит к общей потере, составляющей менее 20%, во время любой отдельной стадии, включая, но этим не ограничиваясь, замену буфера, диафильтрацию, диализ, гель-фильтрацию, ионообменную хроматографию, аффинную хроматографию, нанофильтрацию, ультрафильтрацию, стерильную фильтрацию и тому подобное. В других вариантах способы, предлагаемые в настоящем изобретении, приводят к потере менее 15% удельной активности, присутствующей во время осуществления любой отдельной стадии. В предпочтительном варианте способы, предлагаемые в настоящем изобретении, приводят к потере менее 10% удельной активности после наличия во время осуществления любой отдельной стадии. В конкретном варианте теряется менее 15% удельной активности, присутствующей в извлеченном супернатанте культуры, во время осуществления стадии замены буфера (например, во время диафильтрации или диализа). В предпочтительном варианте теряется менее 10% удельной активности, присутствующей в извлеченном супернатанте культуры, во время осуществления начальной стадии замены буфера (например, во время диафильтрации или диализа).

#### С. Инактивация и/или удаление вирусов

В некоторых вариантах способы, предлагаемые в настоящем изобретении для получения композиции ADAMTS (например, ADAMTS13), будут дополнительно включать по меньшей мере одну стадию инактивации или удаления вирусов. В некоторых вариантах способы, предлагаемые в настоящем изобретении, будут включать по меньшей мере две или по меньшей мере три стадии инактивации или удаления вирусов. Не ограничивающие примеры стадий инактивации или удаления вирусов, которые можно использовать в способах, предлагаемых в настоящем изобретении, включают обработку растворителем с детергентом (публикации Horowitz et al., *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994 (5 Suppl 3): S21-S28 и Kreil et al., *Transfusion* 2003, (43):1023-1028, содержание которых специально включено в настоящее описание путем ссылки в полном объеме для всех целей), нанофильтрацию (публикации Hamamoto et al., *Vox Sang* 1989, (56):230-236 и Yuasa et al., *J Gen Virol.* 1991 (72 (pt 8)):2021-2024, содержание которых специально включено в настоящее описание путем ссылки в полном объеме для всех целей). В предпочтительном варианте настоящее изобретение относится к способам получения композиции ADAMTS (например, ADAMTS13), включающим обработку растворителем и детергентом и нанофильтрацию.

В одном варианте предлагается способ получения безопасной с точки зрения вирусного заражения композиции белка ADAMTS (например, ADAMTS13), причем способ включает стадии: (a) культивирования клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в культуральной среде; (b) извлечения части супернатанта культуральной среды, содержащего белок ADAMTS (например, ADAMTS13); (c) замены супернатанта культуральной среды забуференным раствором, содержащим цинк и кальций, с образованием первой композиции белка ADAMTS (например, ADAMTS13); (d) необязательно дополнительного обогащения белка ADAMTS (например, ADAMTS13) с использованием хроматографической стадии; и (e) осуществления по меньшей мере одной стадии инактивации или удаления вируса с получением, таким образом, безопасной с точки зрения вирусного заражения композиции ADAMTS (например, ADAMTS13). В одном варианте культуральная среда содержит цинк, кальций и необязательно никотинамид (витамин B3). В предпочтительном варианте стадия культивирования клетки включает непрерывное культивирование (например, культивирование с перфузией или культивирование в хеостате). В другом предпочтительном варианте культуру поддерживают при температуре от 34 до 37°C. В еще одном предпочтительном варианте культуру поддерживают при pH от 6,9 до 7,2. В одном варианте стадией удаления вируса является нанофильтрация.

#### 1. Обработка растворителем и детергентом (S/D)

Чтобы инактивировать различные вирусные загрязнения, которые могут присутствовать в культуре ADAMTS, один или несколько промежуточных растворов ADAMTS (например, ADAMTS13) могут быть подвергнуты обработке растворителем и детергентом (S/D). Способы обработки растворов детергентами хорошо известны в данной области (обзор см. в публикации Pelletier JP et al., *Best Pract Res Clin Haematol.* 2006; 19(1):205-42, содержание которой специально включено в настоящее описание путем ссылки в полном объеме для всех целей). Как правило, можно использовать любую стандартную S/D-обработку в сочетании со способами, предлагаемыми в настоящем изобретении. Например, пример про-

токола S/D-обработки приведен ниже.

В одном варианте тритон X-100, твин-20 и три(н-бутил)фосфат (TNBP) добавляют к промежуточному раствору ADAMTS (например, ADAMTS13) в конечных концентрациях, составляющих точно или приблизительно 1,0, 0,3 и 0,3% соответственно. Затем смесь перемешивают при температуре точно или приблизительно от 18 до 25°C в течение по меньшей мере приблизительно 1 ч.

## 2. Нанофильтрация и ультра/диафильтрация

Чтобы уменьшить вирусную нагрузку в композиции белка ADAMTS (например, ADAMTS13), предлагаемой в настоящем изобретении, композицию можно подвергнуть нанофильтрации с использованием подходящего устройства для нанофильтрации. В некоторых вариантах устройство для нанофильтрации будет иметь средний размер пор, составляющий точно или приблизительно от 15 до 200 нм. Примеры нанофильтров, подходящих для такого использования, включают, без ограничения, DVD, DV 50, DV 20 (Pall), Viresolve NFP®, Viresolve NFR® (Millipore), Planova® 15N, 20N, 35N и 75N (Planova). В конкретном варианте нанофильтр может иметь средний размер пор, составляющий точно или приблизительно от 15 до 72 нм, или точно или приблизительно от 19 до 35 нм, или точно или приблизительно 15, 19, 20, 35 или 72 нм. В предпочтительном варианте нанофильтр будет иметь средний размер пор, составляющий точно или приблизительно 19, 20 или 35 нм, такой как фильтр Asahi PLANOVA® 20N или PLANOVA® 35N, или их эквиваленты.

После нанофильтрации фильтрат необязательно можно концентрировать посредством ультрафильтрации и/или можно корректировать состав буфера посредством диафильтрации. В некоторых вариантах ультрафильтрацию осуществляют в каскаде с ситом с открытыми каналами, и мембрана для ультрафильтрации имеет номинальный предел отсека по молекулярной массе (NMWCO) точно или приблизительно менее чем 175 кД, или точно или приблизительно менее чем 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30 или меньше кД. В предпочтительном варианте мембрана для ультрафильтрации имеет NMWCO не более чем 30 кД. В другом предпочтительном варианте мембрана для ультрафильтрации имеет NMWCO не более чем 30 кД.

## 3. Лиофилизация и тепловая обработка

В других вариантах вирусная активность лиофилизированной композиции белка ADAMTS13 (например, ADAMTS13), которая ранее могла быть подвергнута обработке на других стадиях инактивации или удаления вирусов, таких как нанофильтрация, может быть дополнительно снижена тепловой обработкой лиофилизированной композиции. Тепловые обработки для инактивации вирусной нагрузки в факторах крови хорошо известны в данной области (например, см. публикации Piszkiwicz et al., *Thromb Res.* 1987 Jul 15; 47(2):235-41; Piszkiwicz et al., *Curr Stud Hematol Blood Transfus.* 1989; (56):44-54; Epstein and Fricke, *Arch Pathol Lab Med.* 1990 Mar; 114(3):335-40).

## VI. Композиции ADAMTS

Преимущественно было обнаружено, что белки ADAMTS, такие как ADAMTS13, экспрессированные в культурах клеток, дополненных цинком, кальцием и/или никотинамидом (витамином B3), имеют неожиданно высокие удельные активности. Как указано в настоящем описании, были разработаны способы, обеспечивающие непрерывную экспрессию и извлечение таких белков ADAMTS с высокими удельными активностями. Например, способы непрерывного культивирования клеток, предлагаемые в настоящем изобретении, обеспечивают возможность экспрессии более чем 1 мг ADAMTS13 на литр в сутки с удельной активностью более чем 1000 единиц/мг в течение более чем одной недели или дольше. Подобным образом, в настоящем изобретении также предлагаются способы снижения потери активности, с которой обычно сталкиваются во время очистки белка ADAMTS13.

Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к композициям белков ADAMTS (например, композициям ADAMTS13), экспрессированным в культуре клеток согласно способам, предлагаемым в настоящем изобретении. Например, предлагаются композиции белков ADAMTS, в которых белок экспрессирован в результате культивирования клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS, в культуральной среде, дополненной по меньшей мере одним компонентом, выбранным из кальция, цинка и никотинамида (витамина B3). Также предлагаются композиции белков ADAMTS (например, композиции ADAMTS13), которые очищены согласно способу, предлагаемому в настоящем изобретении. Например, предлагаются композиции белков ADAMTS, которые были очищены согласно способу, включающему стадию замены буфера, причем буфер для замены содержит цинк и кальций. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения композицией белка ADAMTS является композиция ADAMTS13.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к композициям белков ADAMTS (например, композициям ADAMTS13), которые получены способом, включающим экспрессию белка ADAMTS в культуре клеток согласно любому способу, предлагаемому в настоящем изобретении. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В родственном аспекте настоящее изобретение относится к композициям белков ADAMTS (например, композициям ADAMTS13), которые получены способом, включающим введение и цинка и кальция по меньшей мере в один буфер во время очистки белка ADAMTS из культуральной среды. В предпочти-

тельном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

Настоящее изобретение относится к композициям белков ADAMTS (например, композициям ADAMTS13), полученным способом, предлагаемым в настоящем изобретении. В одном варианте композицию ADAMTS (например, композицию ADAMTS13) получают в результате культивирования клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS, в культуральной среде, дополненной по меньшей мере одним компонентом, выбранным из кальция, цинка и никотинамида (витамина B3). В конкретном варианте композицию ADAMTS получают посредством культивирования клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS, в культуральной среде, дополненной по меньшей мере двумя компонентами, выбранными из кальция, цинка и никотинамида (витамина B3). В еще одном варианте культуральную среду дополняют кальцием, цинком и никотинамидом (витамином B3). В некоторых вариантах культуральная среда может представлять собой не содержащую животных белков, не содержащую олигопептидов или химически определенную культуральную среду. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В одном варианте композиции белка ADAMTS (например, композицию ADAMTS13) получают посредством культивирования клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ цинка. В другом варианте композицию получают посредством культивирования клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 5 мкМ цинка. В одном варианте композицию получают в результате культивирования клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS, в культуральной среде, содержащей точно или приблизительно от 2 до 12 мкМ цинка. В другом варианте композицию получают в результате культивирования клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS, в культуральной среде, содержащей точно или приблизительно от 5 до 12 мкМ цинка. В следующих вариантах композицию получают в результате культивирования клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мкМ, или, по меньшей мере, точно или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ или больше цинка. В одном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно от 35 до 37°C. В конкретном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно 36°C. В другом варианте pH культуры поддерживают на уровне, составляющем точно или приблизительно от 6,9 до 7,3. В одном варианте температуру и/или pH культуры поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток. В одном варианте способ осуществляют в условиях непрерывной культуры. В конкретных вариантах способ осуществляют в условиях культивирования в хемостате, турбидостате или культивирования с перфузией в режиме суспензии. В других конкретных вариантах способ осуществляют в условиях культивирования в хемостате, турбидостате или культивирования с перфузией в режиме прикрепления. В другом варианте способ осуществляют в условиях периодического культивирования. В конкретных вариантах способ осуществляют в условиях культивирования с получением единичных партий, с многократным получением партий или культивирования с подпиткой в режиме суспензии. В других конкретных вариантах способ осуществляют в условиях культивирования с получением единичных партий, с многократным получением партий или культивирования с подпиткой в режиме прикрепления. В одном варианте клеткой, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS, является клетка млекопитающего. В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток CHO, линия клеток HEK293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В одном варианте композиции белка ADAMTS (например, композиции ADAMTS13) культуральная среда, используемая для экспрессии белка ADAMTS, может быть дополнена цинком в конечной концентрации, составляющей по меньшей мере приблизительно от 2 мкМ до по меньшей мере приблизительно 12 мкМ. В некоторых вариантах культуральная среда может быть дополнена цинком в конечной концентрации, составляющей по меньшей мере приблизительно 2 мкМ или по меньшей мере приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 мкМ, или более высокие уровни цинка. Как правило, можно использовать любую соль цинка для добавки в среды согласно изобретению, не ограничивающие примеры подходящих солей включают  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $ZnSO_3 \cdot 2H_2O$ ,  $(C_6H_5O_7)_2Zn_3 \cdot 2H_2O$ ,  $ZnBr_2$ ,  $ZnBr_2 \cdot 2H_2O$ ,  $ZnCl_2$ ,  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ,  $Zn(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$ ,  $(C_2H_3O_2)_2Zn \cdot 2H_2O$  и тому подобное. В некоторых вариантах используют фармацевтически приемлемую соль цинка для добавления в культуральные среды согласно изобре-

нию. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В другом варианте композицию белка ADAMTS (например, композицию ADAMTS13) получают посредством культивирования клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ кальция. В другом варианте композицию ADAMTS получают в результате культивирования клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 1,5 мМ кальция. В одном варианте композицию ADAMTS получают в результате культивирования клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS, в культуральной среде, содержащей точно или приблизительно от 0,5 до 1,5 мМ кальция. В других вариантах композицию ADAMTS получают в результате культивирования клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,5 мМ или, по меньшей мере, точно или приблизительно 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 мМ или больше кальция. В одном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно от 35 до 37°C. В конкретном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно 36°C. В другом варианте pH культуры поддерживают на уровне, составляющем точно или приблизительно от 6,9 до 7,3. В одном варианте температуру и/или pH культуры поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток. В одном варианте способ осуществляют в условиях непрерывной культуры. В конкретных вариантах способ осуществляют в условиях культивирования в хемостате, турбидостате или культивирования с перфузией в режиме суспензии. В других конкретных вариантах способ осуществляют в условиях культивирования в хемостате, турбидостате или культивирования с перфузией в режиме прикрепления. В другом варианте способ осуществляют в условиях периодического культивирования. В конкретных вариантах способ осуществляют в условиях культивирования с получением единичных партий, с многократным получением партий или культивирования с подпиткой в режиме суспензии. В других конкретных вариантах способ осуществляют в условиях культивирования с получением единичных партий, с многократным получением партий или культивирования с подпиткой в режиме прикрепления. В одном варианте клеткой, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS, является клетка млекопитающего. В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток CHO, линия клеток НЕК293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 мг/л до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

Как правило, можно использовать любую соль кальция для добавления в среды согласно изобретению. Не ограничивающие примеры приемлемых солей включают  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaFPO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaI}_2$ ,  $\text{CaBr}_2$ ,  $(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2\text{Ca}$ ,  $(\text{CHO}_2)_2\text{Ca}$ ,  $(\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6)_2\text{Ca}$ ,  $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2\text{Ca}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  и тому подобное. В некоторых вариантах используют фармацевтически приемлемую соль кальция для добавления в культуральные среды согласно изобретению.

В другом варианте композицию белка ADAMTS (например, композицию ADAMTS13) получают в результате культивирования клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2 мг/л никотинамида (витамина В3). В другом варианте композицию ADAMTS получают в результате культивирования клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 7 мг/л никотинамида (витамина В3). В одном варианте композицию ADAMTS получают в результате культивирования клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS, в культуральной среде, содержащей точно или приблизительно от 2 до 10 мг/л никотинамида (витамина В3). В других вариантах композицию ADAMTS получают в результате культивирования клетки млекопитающего, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS, в культуральной среде, содержащей, по меньшей мере, точно или приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 мг/л, или более высокие концентрации никотинамида (витамина В3). В одном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно от 35 до 37°C. В конкретном варианте культуру поддерживают при температуре, составляющей точно или приблизительно 36°C. В другом варианте pH культуры поддерживают на уровне, составляющем точно или приблизительно от 6,9 до 7,3. В одном варианте температуру и/или pH культуры поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток. В одном варианте способ осуществляют в условиях непрерывной культуры. В конкретных вариантах способ осуществляют в условиях культивирования в хемостате, турбидостате или культивирования с перфузией в режиме суспензии. В других конкретных

вариантах способ осуществляют в условиях культивирования в хемостате, турбидостате или культивирования с перфузией в режиме прикрепления. В другом варианте способ осуществляют в условиях периодического культивирования. В конкретных вариантах способ осуществляют в условиях культивирования с получением единичных партий, с многократным получением партий или культивирования с подпиткой в режиме суспензии. В других конкретных вариантах способ осуществляют в условиях культивирования с получением единичных партий, с многократным получением партий или культивирования с подпиткой в режиме прикрепления. В одном варианте клеткой, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS, является клетка млекопитающего. В конкретных вариантах клеткой млекопитающего является клетка хомячка, человека или мыши. В конкретном варианте клеткой является линия клеток СНО, линия клеток НЕК293 или линия клеток ВНК. В другом варианте клетку млекопитающего культивируют в не содержащей животных белков и/или полипептидов культуральной среде. В еще одном варианте клетку млекопитающего культивируют в синтетической культуральной среде, которая может не содержать или может содержать животные белки и полипептиды. В одном варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 0,5 до 30 мг/л. В другом варианте культуральная среда дополнительно содержит полиамин в концентрации, составляющей точно или приблизительно от 2 до 8 мг/л. В конкретном варианте полиамином является путресцин. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В одном варианте композицию ADAMTS получают в результате культивирования клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в культуральной среде, дополненной и цинком и кальцием. В некоторых вариантах концентрации цинка и кальция могут быть любыми, выбранными из концентраций, описанных в настоящей публикации. В некоторых вариантах концентрации цинка и кальция будут соответствовать одному из вариантов 94-113 (табл. 7). В некоторых вариантах культуру поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток или по меньшей мере 14, 21, 28 суток, или по меньшей мере 5, 6, 7 недель, или по меньшей мере 2 месяцев, или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 месяцев или дольше. В одном варианте культивирование представляет собой культивирование с перфузией. В другом варианте культивирование представляет собой культивирование в хемостате. В других вариантах культивирование представляет собой культивирование с подпиткой или культивирование с многократным получением партий. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В одном варианте композицию ADAMTS получают в результате культивирования клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в культуральной среде, дополненной и цинком и никотинамидом (витамином В3). В некоторых вариантах концентрации цинка и никотинамида (витамина В3) могут быть любыми, выбранными из концентраций, описанных в настоящей публикации. В некоторых вариантах концентрации цинка и никотинамида (витамина В3) будут соответствовать одному из вариантов 114-133 (табл. 8). В некоторых вариантах культуру поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток или по меньшей мере 14, 21, 28 суток, или по меньшей мере 5, 6, 7 недель, или по меньшей мере 2 месяцев, или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 месяцев или дольше. В одном варианте культивирование представляет собой культивирование с перфузией. В другом варианте культивирование представляет собой культивирование в хемостате. В других вариантах культивирование представляет собой культивирование с подпиткой или с многократным получением партий. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В одном варианте композицию ADAMTS получают в результате культивирования клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в культуральной среде, дополненной и кальцием и никотинамидом (витамином В3). В некоторых вариантах концентрации кальция и никотинамида (витамина В3) могут быть любыми, выбранными из концентраций, описанных в настоящей публикации. В некоторых вариантах концентрации кальция и никотинамида (витамина В3) будут соответствовать одному из вариантов 134-149 (табл. 9). В некоторых вариантах культуру поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток или по меньшей мере 14, 21, 28 суток, или по меньшей мере 5, 6, 7 недель, или по меньшей мере 2 месяцев, или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 месяцев или дольше. В одном варианте культивирование представляет собой культивирование с перфузией. В другом варианте культивирование представляет собой культивирование в хемостате. В других вариантах культивирование представляет собой культивирование с подпиткой или с многократным получением партий. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В одном варианте композицию ADAMTS получают в результате культивирования клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS (например, ADAMTS13), в культуральной среде, дополненной цинком, кальцием и никотинамидом (витамином В3). В некоторых вариантах концентрации цинка, кальция и никотинамида (витамина В3) могут быть любыми, выбранными из концентраций, описанных в настоящей публикации. В некоторых вариантах концентрации цинка, кальция и никотинамида (витамина В3) будут соответствовать одному из вариантов 14-93 (табл. 3-6). В некоторых вариантах культуру поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток или по меньшей мере 14 суток, 21 суток, 28 суток, или по меньшей мере 5, 6, 7 недель, или по меньшей мере 2 месяцев, или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 месяцев или дольше. В одном варианте культивирование представляет собой

культивирование с перфузией. В другом варианте культивирование представляет собой культивирование в хемостате. В других вариантах культивирование представляет собой культивирование с подпиткой или с многократным получением партий. В предпочтительном варианте белком ADAMTS является ADAMTS13.

В другом варианте предлагаются композиции ADAMTS13 с высокими удельными активностями, например, с удельной активностью, составляющей по меньшей мере 600 единиц/мг белка A13. В другом варианте композиция ADAMTS13 имеет удельную активность, составляющую по меньшей мере 700 единиц/мг. В другом варианте композиция ADAMTS13 имеет удельную активность, составляющую по меньшей мере 800 единиц/мг. В другом варианте композиция ADAMTS13 имеет удельную активность, составляющую по меньшей мере 900 единиц/мг. В другом варианте композиция ADAMTS13 имеет удельную активность, составляющую по меньшей мере 1000 единиц/мг. В другом варианте композиция ADAMTS13 имеет удельную активность, составляющую по меньшей мере 1100 единиц/мг. В другом варианте композиция ADAMTS13 имеет удельную активность, составляющую по меньшей мере 1200 единиц/мг. В другом варианте композиция ADAMTS13 имеет удельную активность, составляющую по меньшей мере 1300 единиц/мг. В другом варианте композиция ADAMTS13 имеет удельную активность, составляющую по меньшей мере 1400 единиц/мг. В другом варианте композиция ADAMTS13 имеет удельную активность, составляющую по меньшей мере 1500 единиц/мг. В другом варианте композиция ADAMTS13 имеет удельную активность, составляющую по меньшей мере 1600 единиц/мг. В другом варианте композиция ADAMTS13 имеет удельную активность, составляющую по меньшей мере 1700 единиц/мг. В другом варианте композиция ADAMTS13 имеет удельную активность, составляющую по меньшей мере 1800 единиц/мг. В другом варианте композиция ADAMTS13 имеет удельную активность, составляющую по меньшей мере 1900 единиц/мг. В другом варианте композиция ADAMTS13 имеет удельную активность, составляющую по меньшей мере 2000 единиц/мг. В другом варианте композиция ADAMTS13 имеет удельную активность, составляющую по меньшей мере 2100 единиц/мг. В другом варианте композиция ADAMTS13 имеет удельную активность, составляющую по меньшей мере 2200 единиц/мг. В другом варианте композиция ADAMTS13 имеет удельную активность, составляющую по меньшей мере 2300 единиц/мг. В другом варианте композиция ADAMTS13 имеет удельную активность, составляющую по меньшей мере 2400 единиц/мг. В другом варианте композиция ADAMTS13 имеет удельную активность, составляющую по меньшей мере 2500 единиц/мг.

## VII. Примеры

### Пример 1

Эксперименты с подпиткой осуществляли с использованием выращиваемых в биореакторе культур рекомбинантной линии клеток HEK293 1020/1013-2, экспрессирующих ADAMTS13 человека, в химически определенной среде BACD-A13. Исследовали влияние добавки в культуральную среду дополнительного цинка.

Рекомбинантные клетки HEK293, экспрессирующие ADAMTS13 человека, культивировали в виде культур клеток с подпиткой в биореакторах объемом 1,5 л с лопастной мешалкой, с поточным контролем pH на уровне pH 7,20 при 37°C, с концентрацией растворенного кислорода 20% от полного насыщения воздуха. Суспензию клеток переносили в 2 идентичных биореактора, содержащих основанную на DMEM/F12 химически определенную культуральную среду (BACD-A13; табл. 12). Две культуры выращивали в средах BACD-A13, приготовленных либо с 0,432 мг/л  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , как в DMEM/F12, либо с дополнительным добавлением 1 мг/л  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  с получением конечной концентрации 1,432 мг/л. Две культуры с подпиткой во всех других отношениях обрабатывали одинаково, и, следовательно, их можно непосредственно сравнивать друг с другом.

Активность A13 в супернатантах культуры измеряли в анализе FRETTS-VWF73 после центрифугирования или фильтрования супернатантов, чтобы удалить оставшиеся клетки. Общее количество A13 измеряли методом ELISA, используя специфичное для A13 антитело (табл. 10). Супернатант из культуры, в которой использовали среду BACD-A13 со стандартной для DMEM/F12 концентрацией цинка, имел активность A13 728 и 826 миллиединиц/мл на 3 и 6 день соответственно. Удельные активности культур составляли 482 и 526 миллиединиц/мкг A13 соответственно. Напротив, супернатанты из культур, в которые был дополнительно добавлен Zn, при наличии только немного повышенных выходов экспрессии A13 (на 7% и на 19% выше на 3 и 6 день, соответственно), имели значительно повышенные общие и удельные активности A13 (табл. 11). Как можно видеть при сравнении результатов, представленных в таблице 10 и таблице 11, общая FRETTS-VWF73-активность A13 была на 118% выше (1589 по сравнению с 728) на 3 день и на 61% выше (1381 по сравнению с 728) на 6 день в случае культур, выращенных в присутствии 1,432 мг/л  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , по сравнению с культурами, выращенными в присутствии 0,432 мг/л  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ . Подобным образом, удельная активность белка A13 в культурах с добавками была на 104% выше (981 по сравнению с 482 миллиединицами/мкг) на 3 день и на 42% выше (739 по сравнению с 526 миллиединицами/мкг) на 6 день.

Из биореакторов отбирали образцы и анализировали в отношении A13 методом ELISA, активность A13 измеряли в FRETTS-VWF73-анализе. Количество клеток определяли, используя методику Nucleo-

counter. Скорости разведения измеряли и использовали для вычисления скорости роста и объемной продуктивности.

Таблица 10. Данные ферментации для культивирования с подпиткой 1, осуществляемого в биореакторе объемом 1,5 л с использованием среды BACD-A13 без добавления цинка

День сбора супернатанта	Концентрация клеток	Удельная скорость роста	A13 FRETs	A13 ELISA	Удельная активность	Выход FRETs	Выход A13
	[10 <sup>6</sup> клеток/мл]	[1/сутки]	[милли-единиц/мл]	[мкг/мл]	[милли-единиц/мкг]	[единиц/л/сутки]	[мг/л/сутки]
3	2,18	0,619	728	1,51	482	228	0,41
6	1,88	0,256	826	1,57	526	178	0,32

Таблица 11. Данные ферментации для эксперимента с подпиткой, осуществляемого в биореакторе объемом 1,5 л с использованием среды BACD-A13 с добавлением цинка

День сбора супернатанта	Концентрация клеток	Удельная скорость роста	A13 FRETs	A13 ELISA	Удельная активность	Выход FRETs	Выход A13
	[10 <sup>6</sup> клеток/мл]	[1/сутки]	[милли-единиц/мл]	[мкг/мл]	[милли-единиц/мкг]	[единиц/л/сутки]	[мг/л/сутки]
3	2,48	0,662	1589	1,62	981	515	0,45
6	1,38	0,11	1381	1,87	739	249	0,41

Таблица 12. Состав химически определенной среды для культивирования клеток BACD-A13

Состав среды для культивирования клеток BACD-A13	Стандартная концентрация
<b>Аминокислоты</b>	<b>мг/л</b>
L-аланин	13,3500
L-аргинин·HCl	147,5000
L-аспарагин·H <sub>2</sub> O	45,1600
L-аспарагиновая кислота	19,9500
L-цистеин HCl·H <sub>2</sub> O	32,5500
L-цистин·2HCl	102,3500
L-глутаминовая кислота	22,0500
Глицин	26,2500
L-гистидин·H <sub>2</sub> O HCl	51,4800
L-изолейцин	74,4700
L-лейцин	119,0500
L-лизин·HCl	146,2500
L-метионин	100,0000
L-фенилаланин	60,4800
L-пролин	63,7400
L-серин	36,7500
L-треонин	53,4500
L-триптофан	29,0100
L-тирозин 2Na 2H <sub>2</sub> O	75,7900
L-валин	82,8500
<b>Соли</b>	<b>мг/л</b>
Хлорид кальция (CaCl <sub>2</sub> )	Переменный (58,3-174,9)
Сульфат меди (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)	0,0026
Нитрат железа (Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O)	0,0500
Сульфат железа (FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	1,0170
Хлорид магния (MgCl <sub>2</sub> )	28,6400
Сульфат магния (MgSO <sub>4</sub> )	48,8400
Хлорид калия (KCl)	311,8000
Хлорид натрия (NaCl)	5495,5000
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> безводный	106,5100
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> безводный	54,3500
Гептагидрат сульфата цинка (ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	переменный (0,432-3,432)
Селенит натрия безводный	0,0087
<b>Витамины</b>	<b>мг/л</b>
Аскорбиновая кислота	3,499
Биотин	0,0035
Хлорид холина	8,980
D-Са-пантотенат	2,240
Фолиевая кислота	2,650
I-инозит	12,600
Никотинамид	переменный (2,0-7,0)
Пиридоксин·HCl	2,031
Рибофлавин	0,219
Тиамин·HCl	2,170
Витамин B12	0,680
<b>Прочие</b>	<b>мг/л</b>
D-глюкоза	5000,00
Линолевая кислота	0,042
Липоевая кислота	0,105
Путресцин·2HCl	3,681
Тимидин	0,365
Гипоксантин·Na	2,390
Пируват натрия	55,000
	<b>мг/л</b>
L-глутамин	1000,0000
Плюроник F68	1000,0000
Этаноламин	1,5300
Na-бикарбонат	1,5000

## Пример 2

Эксперименты с подпиткой осуществляли с использованием выращиваемых в биореакторе культур рекомбинантной линии клеток CHO #938, экспрессирующих ADAMTS13, в химически определенной среде BACD-A13. Исследовали влияние добавок в культуральную среду дополнительного цинка и/или витамина В3.

Рекомбинантные клетки CHO, экспрессирующие ADAMTS13 человека, адаптировали к химически определенной среде BCS (среда BCS). Клон #938 из рабочего банка клеток для разработок #01 (DWCB#01) размораживали и готовили инокулят клеток в среде BCS. Клетки переносили в 2 биореактора объемом 1,5 л с лопастными мешалками и выращивали в условиях культуры с подпиткой в специально полученной среде BACD-A13 с поточным контролем pH на уровне pH 7,20 при 37°C с концентрацией растворенного кислорода 20% от полного насыщения воздуха. Две культуры выращивали в средах BACD-A13, приготовленных либо с 0,432 мг/л  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , как в DMEM/F12, либо с дополнительным добавлением 1 мг/л  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  с получением конечной концентрации 1,432 мг/л. Две культуры с подпиткой во всех других отношениях обрабатывали одинаково, и, следовательно, их можно непосредственно сравнивать друг с другом. Супернатанты собирали на 4 и 7 день и анализировали в отношении уровня белка A13 и уровня активности. После сбора на 7 день в обе культуры дополнительно добавляли 5 мг/л никотинамида (витамина В3) с получением конечной концентрации 7,02 мг/л и выращивали в идентичных условиях еще в течение 4 суток. Супернатанты снова собирали на 11 день и анализировали уровни белка A13 и уровни активности.

В первой культуре, выращиваемой без добавки цинка, уровни активности A13 в собранном супернатанте составляли 642 и 488 миллиединиц/мл на 4 и 7 день соответственно (табл. 13). Удельные активности таких супернатантов составляли 371 и 273 миллиединиц/мкг на 4 и 7 день соответственно. Как показано ранее в примере 1, общая и удельная активности A13 в супернатанте культуры с добавлением дополнительного цинка были значимо повышены (сравн. данные в табл. 13 и 14 в отношении сбора на 4 и 7 день). Как и ранее, общие уровни A13, полученные в обеих культурах, были сходными, однако A13 из супернатанта второй культуры, в которую дополнительно добавляли цинк, обладал на 40 и 104% более высокой общей активностью на 4 и 7 день соответственно, а также на 78 и 75% более высокой удельной активностью на 4 и 7 день (табл. 14 по сравнению с табл. 13). Другие параметры, включая общий выход A13 и скорость роста клеток, по-видимому, не изменялись под влиянием дополнительного добавления цинка.

После сбора супернатантов на 7 день в обе культуры добавляли дополнительно 5 мг/л никотинамида (витамина В3) и выращивали в идентичных условиях дополнительно еще в течение 4 суток. Супернатанты собирали, как и ранее на 11 день. Добавка витамина В3 приводила к увеличению общей FRET5-VWF73-активности и удельной активности A13 в супернатантах обеих культур (табл. 13 и 14, 11 день). Причем такие значения почти удваивались в обеих культурах. На 11 день в супернатанте из культуры 2, в которую добавляли цинк и витамин В3, наблюдали почти на 200% более высокую (2366 по сравнению с 791 миллиединиц/мл) общую активность и на 174% более высокую (1189 по сравнению с 432 миллиединиц/мкг) удельную активность, чем в супернатанте, собранном из культуры 1.

Дополнение среды только одним никотинамидом приводило приблизительно к 60% повышению общей активности (791 миллиединиц/мл по сравнению с 488 миллиединиц/мл; сравн. данные в табл. 13 для 7 и 11 дня) и удельной активности (432 миллиединиц/мкг по сравнению с 273 миллиединиц/мкг; сравн. данные в таблице 13 для 7 и 11 дня) A13. Подобным образом, дополнение среды только одним цинком приводило к повышению приблизительно на 70-80% общей активности и удельной активности A13 (сравн. табл. 13 и 14, данные для 4 и 7 дня). Неожиданно, дополнение культуральной среды и никотинамидом и цинком приводило к синергетическому повышению приблизительно на 300-400% общей активности (сравн. табл. 14, 11 день) и табл. 13, 4 и 7 дни) и приблизительно на 200-300% удельной активности (сравн. табл. 14, 11 день) и табл. 13, 4 и 7 дни) A13, что свидетельствует о неожиданном синергетическом взаимодействии эффектов цинка и никотинамида.

Таблица 13. Данные эксперимента по периодической ферментации  
CP 07/18 M04: hA13 CHO, клон #985/1 938 DWCB#01

День сбора супернатанта	Концентрация клеток	Удельная скорость роста	A13 FRET5	A13 ELISA	Удельная активность	Выход FRET5	Выход A13
	[10 <sup>6</sup> клеток/мл]	[1/сутки]	[миллиединиц/мл]	[мкг/мл]	[миллиединиц/мкг]	[единиц/л/сутки]	[мг/л/сутки]
4*	2,33	0,539	642	1,73	371	161	0,43
7*	1,58	0,407	488	1,79	273	120	0,48
11 <sup>†</sup>	1,65	0,413	791	1,83	432	173	0,37

\*BAV-CD-A13; 0,432 мг/л  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 2 мг/л никотинамида,

†BAV-CD-A13; 0,432 мг/л  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 7 мг/л никотинамида.

Таблица 14. Данные эксперимента по периодической ферментации  
CP\_07/18 M07: hA13 CHO, клон #985/1 985 DWCB#01

День сбора супернатанта	Концентрация клеток	Удельная скорость роста	A13 FRET5	A13 ELISA	Удельная активность	Выход FRET5	Выход A13
	[10 <sup>6</sup> клеток/мл]	[1/сутки]	[миллиединиц/мл]	[мкг/мл]	[миллиединиц/мкг]	[единиц/л/сутки]	[мг/л/сутки]
4*	1,73	0,527	898	1,36	660	224	0,34
7*	2,10	0,505	996	2,08	479	252	0,57
11 <sup>†</sup>	1,88	0,420	2366	1,99	1189	550*	0,41

\*BAV-CD-A13; 1,432 мг/л ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 2 мг/л никотинамида;†BAV-CD-A13; 1,432 мг/л ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 7 мг/л никотинамида.

## Пример 3

Хемотратную клеточную культуру рекомбинантной линии клеток CHO #640-2, экспрессирующих ADAMTS13 человека, выращивали в химически определенной среде BACD-A13, дополненной дополнительным цинком и витамином В3. Культуру объемом 10 л поддерживали в течение 53 суток и продукцию белка A13 и активность измеряли с течением времени.

Рекомбинантные клетки CHO, экспрессирующие ADAMTS13 человека, адаптировали к химически определенной специально приготовленной среде (среде BCS). Флакон из банка клеток размораживали и готовили инокулят клеток в среде BCS. Клетки, размноженные из экспрессирующего A13 клона #640-2, переносили в биореактор объемом 10 л с мешалкой Раштона и культивировали в культурах с многократным получением партий в специальной среде BACD-A13 с поточным контролем pH на уровне pH 7,15-7,20 при 37°C с концентрацией растворенного кислорода 20% от полного насыщения воздуха. После выращивания 2 периодических культур до конечного рабочего объема 10 л биореактор переводили в режим непрерывной подачи среды на 5 день и осуществляли его работу еще в течение 48 суток в режиме хемотата.

Образцы супернатанта из биореакторов брали еженедельно и анализировали в отношении продуцирования белка A13 методом ELISA и в отношении активности A13 в FRET5-VWF73-анализе. Количество клеток определяли с использованием методики Nucleocounter. Измеряли скорости разведения и использовали для вычисления скоростей роста и объемной продуктивности.

В условиях непрерывной культуры с использованием химически определенной среды BACD-A13, дополненной цинком и никотинамидом в конечной концентрации 1,432 мг/л ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O и 7,02 мг/л никотинамида, получали высокие уровни продукции белка A13, от 0,9 до 1,3 мг/л/сутки, и высокие удельные активности, приблизительно от 800 до 1100 миллиединиц/мкг A13 (табл. 15). Полученные результаты были сопоставимы с продукцией белка и удельными активностями белка в случае клона CHO #938, представленными в примере 2. Причем объемная продуктивность и специфичная для клеток продуктивность возрастали с течением времени в долговременной культуре, вероятно, вследствие возрастания скорости роста и скорости разведения с течением времени. Высокую удельную активность экспрессированного A13 можно поддерживать, по меньшей мере, на постоянно высоком уровне в течение по меньшей мере всех 7 недель выращивания культуры в условиях хемотата. В действительности, удельная активность A13, полученного в культуре, на самом деле возрастала приблизительно от 800 миллиединиц/мкг A13 на 2 неделе до приблизительно 1100 миллиединиц/мкг A13 на 7 неделе.

Таблица 15. Данные эксперимента по непрерывной ферментации  
CP\_07/30 F02: hA13 CHO клон #987/1 640-2

№ недели культивирования в хемотате	Концентрация клеток	Удельная скорость роста	Скорость разведения	A13 FRET5	A13 ELISA	Удельная активность	Выход FRET5	Выход A13
	[10 <sup>6</sup> клеток/мл]	[1/сутки]	[1/сутки]	[миллиединиц/мл]	[мкг/мл]	[миллиединиц/мкг]	единиц/л/сутки]	[мг/л/сутки]
2	1,43	0,36	0,36	1954	2,48	788	713	0,91
3	1,56	0,41	0,40	2254	2,32	972	913	0,94
4	1,46	0,38	0,40	2244	2,41	931	889	0,95
5	1,58	0,43	0,43	2514	2,88	873	1086	1,24
6	1,70	0,51	0,46	2737	2,71	1010	1270	1,26
7	1,76	0,53	0,52	2322	2,18	1065	1200	1,13

## Пример 4

Эксперименты по культивированию клеток с подпиткой и культивированию клеток в хемотате осуществляли, используя биореакторные культуры рекомбинантных линий клеток CHO #640-2, экспрессирующих ADAMTS13 человека, в химически определенной среде BACD-A13. Исследовали влияние добавки в культуральную среду разных уровней цинка.

Рекомбинантные клетки CHO, экспрессирующие ADAMTS13 человека, адаптировали к химически определенной специально приготовленной среде, среде BCS, в режиме с подпиткой. В кратком изложении, DWCB#05 размораживали и готовили инокулят клеток в среде BCS. Клетки переносили в биореакторы объемом 1,5 л с лопастной мешалкой и специально приготовленной средой BACD-A13, дополненной никотинамидом в конечной концентрации 7 мг/л, но без добавления цинка, с поточным контролем

pH на уровне 7,20 при 37°C с концентрацией растворенного кислорода 20% от полного насыщения воздуха. Затем суспензию периодической культуры разделяли и помещали в три идентичных биореактора, содержащих среду BACD-A13, дополненную никотинамидом в конечной концентрации 7 мг/л с разными добавками Zn (0, 0,5 и 1,0 мг/л ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O до конечной концентрации 0,432, 0,932 и 1,432 мг/л ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O).

Среды BACD-A13 содержали 0,432 мг/л ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O с добавлением или без добавления дополнительного цинка. В остальном культуры и среда были одинаковыми и, следовательно, их можно непосредственно сравнивать друг с другом. Культуры выращивали в режиме с подпиткой в течение приблизительно одной недели и супернатант анализировали в отношении продукции белка A13 и FRETС-VWF73-активности. Затем все три биореактора переводили в режим хемостатного культивирования, и они функционировали в течение приблизительно 2 недель в условиях непрерывной культуры с использованием среды с разными добавками цинка, как описано выше.

В условиях культивирования с подпиткой, в соответствии с результатами, наблюдаемыми в примерах 1 и 2, добавка в среду либо 0,5 мг/л, либо 1,0 мг/л ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O значительно повышала удельную активность белка A13 в супернатанте (785 и 876 миллиединиц/мкг соответственно) по сравнению со средой без дополнительной добавки цинка (437 миллиединиц/мкг) (табл. 16). Как указано выше, добавка дополнительного цинка не оказывала влияния на другие параметры, включая общую продукцию белка A13 и удельную скорость роста.

Таблица 16. Данные экспериментов по ферментации с подпиткой для экспрессии A13 человека в среде с дополнительным добавлением и без дополнительного добавления цинка

Дополнительный цинк	Концентрация клеток	Удельная скорость роста	A13 FRETС	A13 ELISA	Удельная активность	Выход FRETС	Выход A13
	[10 <sup>6</sup> клеток/мл]	[1/сутки]	[миллиединиц/мл]	[мкг/мл]	[миллиединиц/мкг]	[единиц/л/сутки]	[мг/л/сутки]
0	1,44	0,420	853,0	1,952	437	230,3	0,506
0,5 мг/л	1,73	0,502	1687,7	2,151	785	470,0	0,563
1,0 мг/л	1,44	0,441	1589,2	1,814	876	430,8	0,472

После перевода биореакторов в режим хемостата культуры выращивали в условиях непрерывной культуры в течение приблизительно одной недели (неделя 2), используя среды с разными добавками цинка, как описано выше. Образцы супернатанта из биореакторов брали еженедельно и анализировали в отношении продукции белка A13 методом ELISA и в отношении активности A13 в FRETС-VWF73-анализе. Подобно результатам, наблюдаемым в случае культур, выращиваемых в режиме с подпиткой, добавка в ростовую среду, используемую для непрерывного роста культуры, дополнительного цинка приводила к значимому повышению удельной активности A13 (697 и 729 миллиединиц/мкг в случае добавки 0,5 и 1,0 мг/л ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O соответственно) через неделю по сравнению с выращиванием в среде без добавки (553 миллиединиц/мкг) (табл. 17, 18 и 19).

Ранее было показано, что удельная активность A13, экспрессированного в условиях непрерывного культивирования клеток, действительно повышается в течение длительного периода времени (см. пример 3). Чтобы исследовать, можно ли повторить такой результат, культуры, выращиваемые в среде, дополненной дополнительным количеством цинка, продолжали культивировать дополнительно в течение недели. Как видно в табл. 18 и 19, удельная активность A13 в супернатантах обеих культур снова возрастала с течением времени. Удельная активность A13, выявленная в супернатанте среды, дополненной 0,5 мг/л ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, возросла от 697 миллиединиц/мг на 2 неделе до 759 миллиединиц/мг на 3 неделе (табл. 18). Подобным образом, удельная активность A13, выявленная в супернатанте среды, дополненной 1,0 мг/л ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, возросла с 729 миллиединиц/мг на 2 неделе до 812 миллиединиц/мг на 3 неделе (табл. 19). Как указано выше, добавка дополнительного цинка не влияла на удельный рост клеток. Однако примечательно, что продукция белка A13, по-видимому, возросла в обеих культурах с добавлением дополнительного цинка по сравнению с продукцией в культурах без добавления цинка.

Таблица 17. Результаты ферментации в случае экспериментов по культивированию клеток в хемостате без дополнительного добавления цинка

№ недели культивирования в хемостате	Концентрация клеток	Удельная скорость роста	Скорость разведения	A13 FRETС	A13 ELISA	Удельная активность	Выход FRETС	Выход A13
	[10 <sup>6</sup> клеток/мл]	[1/сутки]	[1/сутки]	[миллиединиц/мл]	[мкг/мл]	[миллиединиц/мкг]	[единиц/л/сутки]	[мг/л/сутки]
2	1,25	0,340	0,339	1091,8	1,973	553	370,1	0,669

Таблица 18. Результаты ферментации в случае экспериментов по культивированию клеток в хемостате с добавлением дополнительно 0,5 мг/л цинка

№ недели культивирования в хемостате	Концентрация клеток	Удельная скорость роста	Скорость разведения	A13 FRETs	A13 ELISA	Удельная активность	Выход FRETs	Выход A13
	[10 <sup>6</sup> клеток/мл]	[1/сутки]	[1/сутки]	[миллиединиц/мл]	[мкг/мл]	[миллиединиц/мкг]	[единиц/л/сутки]	[мг/л/сутки]
2	1,37	0,350	0,341	1725,5	2,476	697	588,4	0,844
3	1,37	0,362	0,353	1971,7	2,597	759	696,0	0,917

Таблица 19. Результаты ферментации в случае экспериментов по культивированию клеток в хемостате с добавлением дополнительно 1,0 мг/л цинка

№ недели культивирования в хемостате	Концентрация клеток	Удельная скорость роста	Скорость разведения	A13 FRETs	A13 ELISA	Удельная активность	Выход FRETs	Выход A13
	[10 <sup>6</sup> клеток/мл]	[1/сутки]	[1/сутки]	[миллиединиц/мл]	[мкг/мл]	[миллиединиц/мкг]	[единиц/л/сутки]	[мг/л/сутки]
2	1,21	0,327	0,340	1681,7	2,307	729	571,8	0,784
3	1,21	0,330	0,353	1892,2	2,331	812	667,9	0,823

#### Пример 5

Эксперименты по культивированию клеток с подпиткой и культивированию клеток в хемостате осуществляли с использованием биореакторных культур рекомбинантной линии клеток CHO #F6, экспрессирующих ADAMTS13 человека, в химически определенной среде BACD-A13. Исследовали влияние добавки в культуральную среду высоких уровней цинка.

Рекомбинантные клетки CHO, экспрессирующие ADAMTS13 человека, адаптировали к химически определенной специально приготовленной среде, среде BCS, в режиме с подпиткой. Адаптированные популяции субклонировали и получали клон #F6.

В кратком изложении, DWCB#19 размораживали и готовили инокулят клеток в среде BCS. Клетки переносили в три биореактора объемом 1,5 л с лопастной мешалкой и специально приготовленной средой BACD-A13, которую дополняли 1,0, 2,0 и 3,0 мг/л ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O с получением конечных концентраций 1,432, 2,432 и 3,432 мг/л ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O соответственно. Культуры выращивали с поточным контролем pH на уровне 7,15 при 36°C с концентрацией растворенного кислорода 20% от полного насыщения воздуха.

Культуры выращивали в режиме многократного получения партий (3 партии) в течение приблизительно одной недели и супернатант анализировали в отношении продукции белка A13 и FRETs-VWF73-активности. Затем все три биореактора переводили в режим хемостатного культивирования, и они функционировали в течение 10 суток в условиях непрерывной культуры, при этом использовали среды с разными добавками цинка, как описано выше. В условиях культивирования с подпиткой добавка в культуральные среды возрастающих количеств цинка дополнительно повышала удельную активность A13, секретированного в супернатанты культуры. В соответствии с предыдущими результатами, представленными выше, добавление в среду дополнительно 1,0 мг/л ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O приводило к высокой удельной активности, составляющей 806 миллиединиц/мкг. Дальнейшее увеличение концентрации цинка, т.е. добавление 2,0 и 3,0 мг/л приводило в еще более высоким уровням удельной активности A13 (880 и 889 миллиединиц/мкг соответственно) (табл. 20). Как и ранее, добавление дополнительного цинка не оказывало влияния на другие параметры, включая общую продукцию A13 и удельную скорость роста.

Таблица 20. Результаты ферментации в случае экспериментов по периодическому культивированию с дополнительным добавлением цинка (средние данные для 3 партий)

Дополнительный цинк	Концентрация клеток	Удельная скорость роста	A13 FRETs	A13 ELISA	Удельная активность	Выход FRETs	Выход A13
	[10 <sup>6</sup> клеток/мл]	[1/сутки]	[миллиединиц/мл]	[мкг/мл]	[миллиединиц/мкг]	[единиц/л/сутки]	[мг/л/сутки]
1,0 мг/л	1,78	0,592	1666,6	2,074	806	633,8	0,687
2,0 мг/л	1,68	0,596	1678,0	1,883	880	621,8	0,619
3,0 мг/л	1,55	0,589	1670,1	1,844	889	580,8	0,625

После перевода биореакторов в режим хемостата культуры выращивали в условиях непрерывной культуры в течение 10 суток, используя среды с разными добавками цинка, как описано выше. Образцы супернатанта из биореакторов анализировали в отношении продукции белка A13 методом ELISA и в отношении активности A13 в FRETs-VWF73-анализе. В отличие от результатов, наблюдаемых в случае культур, выращиваемых в режиме с подпиткой, добавление в ростовую среду, используемую для непрерывного роста культуры, более высоких уровней цинка приводило к снижению удельной скорости роста

и общей жизнеспособности клеток. Хемостатная культура, выращиваемая в среде с добавлением дополнительно 1,0 мг/л  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , продолжала проявлять высокую жизнеспособность клеток (88,6%) и высокую удельную скорость роста (0,256 в сутки) (табл. 21), что согласуется с предыдущими результатами, описанными выше.

Напротив, в культурах, выращиваемых в средах, дополненных более высокими уровнями  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 2,0 и 3,0 мг/л, наблюдали значимое снижение уровней жизнеспособности клеток (72,1 и 80,4% соответственно) и удельных скоростей роста (0,091 и 0,134 в сутки соответственно). Однако при этом удельная активность A13 в супернатантах двух культур оставалась высокой (863 и 771 миллиединиц/мкг соответственно) (табл. 21).

Таблица 21. Результаты ферментации в случае экспериментов по культивированию клеток в хемостате с дополнительным добавлением цинка

Дополнительный цинк	Концентрация клеток	Удельная скорость роста	Скорость разведения	Жизнеспособность клеток	A13 FRET5	A13 ELISA	Удельная активность	Выход FRET5	Выход A13	Потребление глюкозы
	[10 <sup>8</sup> клеток/мл]	[1/сутки]	[1/сутки]	[%]	[миллиединиц/мл]	[мкг/мл]	[миллиединиц/мкг]	[единиц/л/сутки]	[мг/л/сутки]	[г/л/сутки]
1,0 мг/л	1,28	0,256	0,336	88,6	2716,0	3,127	868	911,5	1,050	1,21
2,0 мг/л	0,55	0,091	0,321	72,1	1408,9	1,632	863	452,7	0,524	0,58
3,0 мг/л	0,56	0,134	0,321	80,4	1359,8	1,763	771	436,5	0,566	0,64

#### Пример 6

Белок A13 человека экспрессировали в рекомбинантной линии клеток CHO #640-2 в химически определенной среде BACD-A13, в которую добавляли дополнительное количество цинка и никотинамида, в биореакторах объемом 50 л. После сбора супернатантов культур осуществляли сравнение стадий ультра/диафильтрации (50 кД), используя буферы с добавлением и без добавления цинка и кальция.

Рекомбинантные клетки CHO, экспрессирующие ADAMTS13 человека, адаптировали к химически определенной специально приготовленной среде, среде BCS. В кратком изложении, DWCB размораживали и готовили инокулят клеток в среде BCS. Клетки переносили через биореактор объемом 10 л в реактор объемом 50 л с мешалкой Раштона и культивировали в режиме хемостата в специально приготовленной среде BACD-A13 с поточным контролем pH на уровне 7,15-7,20 при 37°C с концентрацией растворенного кислорода 20% от полного насыщения воздуха.

Супернатанты из биореакторов фильтровали и собранный бесклеточный материал подвергали ультрафильтрации, используя мембрану PES 50 кД (коэффициент концентрирования приблизительно 1:10), и затем подвергали диафильтрации с использованием 5 объемов буфера, содержащего 50 mM NaCl и 20 mM трис, pH 7,7. Сравнивали буферы для диафильтрации с добавлением или без добавления 2 mM Ca и 5 мкМ Zn, чтобы определить влияние на потерю активности при диафильтрации и хроматографической очистке.

Удельные активности, регистрируемые в миллиединицах FRET5-VWF73 на мкг A13, выявленного методом ELISA, определяли сразу после диафильтрации и перед загрузкой образца для дальнейшей очистки. Образцы хранили при температуре приблизительно от 2 до 8°C максимум в течение 3 суток (менее чем приблизительно 80 часов). Когда образцы хранили в течение более длительных периодов времени, их хранили при температуре менее чем -15°C после окончания диафильтрации и до начала хроматографии. Образцы измеряли и сравнивали сразу после диафильтрации и перед загрузкой на хроматографическую колонку.

Несмотря на относительно короткое время хранения от стадий ультра/диафильтрации до стадий дополнительной очистки, происходит значимая потеря удельной активности A13 (23,3%) в том случае, когда в буфере для диафильтрации отсутствуют цинк и кальций. Напротив, когда использовали буфер для диафильтрации, содержащий 2 mM Ca и 5 мкМ Zn, потеря удельной активности A13 (7,3%) была сильно уменьшена (табл. 22).

Таблица 22. Результаты экспериментов по диафильтрации с использованием буфера для диафильтрации с добавлением и без добавления кальция и цинка

Образец	Диафильтрация	Удельная активность после фильтрации	Удельная активность загружаемого для очистки материала	% потери активности
1	без Ca/Zn	999	740	25,9
2	без Ca/Zn	924	734	20,6
Среднее	без Ca/Zn	962	737	23,3
Стандартное отклонение	без Ca/Zn	53	4,2	не анализировали
3	с Ca/Zn	849	835	1,6
4	с Ca/Zn	951	985	-3,6
5	с Ca/Zn	929	877	5,6
6	с Ca/Zn	1131	844	25,4
Среднее	с Ca/Zn	965	885	7,3
Стандартное отклонение	с Ca/Zn	119	68,9	не анализировали

## Пример 7

Сравнивали способы непрерывного культивирования в хемостате и с перфузией, чтобы определить относительную продукцию и удельную активность A13, экспрессированного в нескольких рекомбинантных линиях клеток CHO.

В кратком изложении, разные клоны рекомбинантных клеток CHO, экспрессирующих рекомбинантный A13 человека, адаптировали к химически определенной специально приготовленной среде (BCS), которую использовали для приготовления инокулятов. Затем клетки культивировали в биореакторе в специально приготовленной среде BACD-A13, дополненной цинком и никотинамидом в конечных концентрациях 1,432 мг/л  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  и 7,02 мг/л никотинамида. Затем инокуляты из каждого клона переносили в два биореактора, в одном из которых осуществляли культивирование в хемостатных условиях (CST), а в другом в условиях перфузии, как указано в табл. 23. Клетки культивировали при плотности, составляющей приблизительно от  $2 \times 10^6$  до  $4 \times 10^6$  клеток/мл, на микроносителях Cytopore™ II (GE Biosciences).

Культуры выращивали в условиях непрерывной культуры в течение 3-4 недель и периодически анализировали образцы супернатантов из биореакторов в отношении продукции белка A13 методом ELISA и в отношении активности A13 в FRETTS-VWF73-анализе. Значения, приведенные в табл. 23, представляют собой средние значения для 3-4-недельного периода. В соответствии с результатами, полученными в примерах 1-6, описанных выше, культуры, выращенные в условиях хемостата, давали приблизительно от 1 мг/л/сутки до приблизительно 2 мг/л/сутки белка A13, обладающего высокой удельной активностью приблизительно от 700 миллиединиц/мкг до приблизительно 1000 миллиединиц/мкг (табл. 23). Удивительно, что в культурах, выращиваемых в условиях культивирования с перфузией, каждый раз выявляли более высокий уровень продукции белка и более высокий уровень активности A13 в супернатанте культуры, чем в случае идентичных клонов, выращиваемых в условиях хемостата. Удельные активности в случае A13, продуцируемого в культурах с перфузией, были очень высокими, при этом в трех из четырех клонов выявлено по меньшей мере приблизительно 1000 миллиединиц/мкг.

Таблица 23. Сравнение результатов экспериментов по культивированию клеток в хемостате и культивированию клеток с перфузией

Клон	Объем [л]	Режим	Удельная активность	Выход FRETTS	Выход A13
			[миллиединиц/ мкг]	[единиц/л/ сутки]	[мг/л/сутки]
F6	50,0	CST	800	800	1,0
F6	10,0	Перфузия	1000	1600	1,6
D6	1,5	CST	690	900	1,3
D6	1,5	Перфузия	890	1700	1,9
X1	1,5	CST	1040	2400	2,3
X1	1,5	Перфузия	1000	2600	2,6
E2	1,5	CST	710	500	0,7
E2	1,5	Перфузия	1000	1600	1,6

## Пример 8

Чтобы определить влияние температуры и pH на продукцию рекомбинантного белка ADAMTS13 человека при выращивании культуры эукариотических клеток с использованием химически определенной не содержащей животных белков культуральной среды, культуры выращивали при температурах от 35,0 до 38,0°C при pH от 7,05 до 7,30.

В кратком изложении, рекомбинантные клетки CHO, экспрессирующие A13 человека, переносили в биореакторы объемом 1,5 л с лопастными мешалками в специально приготовленную среду BACD-A13. Культуры выращивали с поточным контролем pH на уровне от 7,05 до 7,30 при температурах в диапазоне от 35 до 38°C с концентрацией растворенного кислорода 20% от полного насыщения воздуха. Эксперименты планировали и проводили с использованием методики поверхности отклика. Статистический анализ осуществляли, используя пакет статистических компьютерных программ Minitab® 15.1.0.0.

Из биореакторов брали образцы и анализировали в отношении A13 методом ELISA, активность A13 измеряли в FRETTS-VWF73-анализе. Количество клеток определяли, используя методику Nucleocounter. Измеряли скорости разведения и использовали для вычисления скоростей роста и объемной продуктивности.

Как можно видеть на фиг. 1 и 2, и температура и pH оказывали значимое влияние на объемную продуктивность A13 (измеренную с использованием FRETTS-VWF73, фиг. 1) и удельную активность (активность FRETTS-VWF73/антиген в ELISA, фиг. 2). В частности, максимальная объемная FRETTS-продуктивность была достигнута в культурах, выращиваемых в более низком диапазоне pH, приблизительно от 7,05 до 7,2, особенно при pH приблизительно 7,10 и температурах приблизительно от 35,0 до 37,0°C, особенно при температуре приблизительно 36°C. В частности, максимальная удельная активность (FRETTS-VWF73 к количеству антигена в ELISA) была достигнута в культурах, выращиваемых в более низком диапазоне pH, приблизительно от 7,05 до 7,2, особенно ниже 7,10, и при температурах приблизительно от 35,0 до 37,0°C, особенно ниже 36°C. В частности, оптимальные условия для продуцирования A13 были достигнуты при сочетании температуры приблизительно 36°C и pH приблизительно 7,10 в отношении оптимального выхода и качества продукта.

Следует понимать, что примеры и варианты, описанные в настоящей публикации, приведены только с целью иллюстрации и что различные модификации или изменения в свете приведенного описания могут быть предложены специалистами в данной области, и такие модификации или изменения должны быть включены в сущность и объем настоящей заявки и в объем прилагаемой формулы изобретения. Все публикации, патенты и заявки на выдачу патентов, цитированные в настоящей публикации, включены в настоящее описание путем ссылки в полном объеме для всех целей.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ экспрессии белка дезинтегрина и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина 13 (ADAMTS13), причем способ включает культивирование клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS13, в культуральной среде, содержащей от 3 до 12 мкМ цинка.
2. Способ по п.1, в котором культуральная среда содержит по меньшей мере 5 мкМ цинка.
3. Способ по п.1 или 2, в котором культуральная среда содержит:
  - (a) по меньшей мере 0,5 мМ кальция или
  - (b) между 0,5 и 1,5 мМ кальция.
4. Способ по любому из пп.1-3, в котором культуральная среда дополнительно содержит:
  - (a) по меньшей мере 2 мг/л никотинамида (витамина В3) или
  - (b) между 2 и 10 мг/л никотинамида.
5. Способ по любому из пп.1-4, в котором культуральная среда дополнительно содержит по меньшей мере 0,5 мг/л полиамина.
6. Способ по п.5, в котором полиамин представляет собой путресцин.
7. Способ по п.6, в котором культуральная среда содержит между 2 и 8 мг/л путресцина.
8. Способ по любому из пп.1-7, в котором культуральная среда не содержит животных белков или является химически определенной.
9. Способ по любому из пп.1-8, в котором клетка выбрана из группы, состоящей из бактериальной клетки, дрожжевой клетки, клетки насекомого, клетки птицы и клетки млекопитающего.
10. Способ по п.9, в котором клеткой млекопитающего является линия клеток, выбранная из группы, состоящей из линии клеток человека, линии клеток хомячка и линии клеток мыши.
11. Способ по п.10, в котором линия клеток выбрана из группы, состоящей из линии клеток CHO, линии клеток ВНК и линии клеток НЕК.
12. Способ по любому из пп.1-11, в котором нуклеиновая кислота, кодирующая белок ADAMTS, дополнительно содержит индуцируемый промотор.
13. Способ по любому из пп.1-12, в котором способ включает периодическое культивирование клеток.
14. Способ по п.13, в котором периодическое культивирование клеток представляет собой культивирование с многократным получением партий или культивирование клеток с подпиткой.
15. Способ по любому из пп.1-12 и 14, в котором способ включает непрерывное культивирование клеток.
16. Способ по п.15, в котором непрерывное культивирование клеток включает непрерывное культивирование клеток в суспензии или непрерывное культивирование прикрепленных клеток.
17. Способ по п.16, в котором:
  - (a) непрерывное культивирование клеток в суспензии осуществляют в режиме хемостата или
  - (b) непрерывное культивирование прикрепленных клеток осуществляют в режиме перфузии.
18. Способ по п.16 или 17, в котором для культивирования клетки используют микроноситель.
19. Способ по п.18, в котором микроносителем является пористый микроноситель.
20. Способ по любому из пп.14-19, в котором:
  - (a) культуру поддерживают в течение по меньшей мере 7 суток;
  - (b) культуру поддерживают в течение по меньшей мере одного месяца или
  - (c) культуру поддерживают в течение по меньшей мере двух месяцев.
21. Способ по любому из пп.1-20, в котором культуру поддерживают при температуре между 35 и 37°C.
22. Способ по любому из пп.1-21, в котором:
  - (a) культуру поддерживают при pH между 6,9 и 7,3 или
  - (b) культуру поддерживают при pH между 7,05 и 7,15.
23. Способ по любому из пп.1-22, в котором культуральная среда дополнительно содержит по меньшей мере 7 мг/л никотинамида.
24. Способ по любому из пп.1-23, в котором удельная активность белка ADAMTS13 в культуральной среде:
  - (a) составляет по меньшей мере 600 единиц на миллиграмм белка ADAMTS13 или
  - (b) составляет по меньшей мере 800 единиц на миллиграмм белка ADAMTS13.
25. Способ по любому из пп.1-24, в котором культура дает:

(a) по меньшей мере 400 единиц активности ADAMTS13 на 1 л культуры в сутки (единиц/л/сутки) или

(b) по меньшей мере 800 единиц активности ADAMTS13 на 1 л культуры в сутки (единиц/л/сутки).

26. Способ получения композиции ADAMTS, причем способ включает стадии:

(a) культивирования клетки, несущей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ADAMTS, в культуральной среде, не содержащей животных белков;

(b) извлечения фракции супернатанта из культуры;

(c) осуществления стадии фильтрования или центрифугирования, чтобы удалить любые оставшиеся клетки;

(d) осуществления стадии ультрафильтрации для концентрирования белка ADAMTS и

(e) осуществления стадии диафильтрации с использованием буфера, содержащего по меньшей мере 0,5 мкМ цинка и по меньшей мере 0,1 мМ кальция; с получением, таким образом, композиции ADAMTS.

27. Способ по п.26, в котором стадия культивирования (a) включает периодическое культивирование клеток.

28. Способ по п.26, в котором стадия культивирования (a) включает непрерывное культивирование клеток.

29. Способ по любому из пп.26-28, в котором культуральная среда содержит по меньшей мере 0,5 мМ кальция.

30. Способ по любому из пп.26-29, в котором культуральная среда содержит по меньшей мере 3 мкМ цинка.

31. Способ по любому из пп.26-30, в котором культуральная среда содержит от 3 до 12 мкМ цинка.

32. Способ по любому из пп.26-31, в котором культуральная среда содержит по меньшей мере 5 мМ цинка.

33. Способ по любому из пп.26-32, в котором культуральная среда содержит по меньшей мере 2 мг/л никотинамида (витамина В3).

34. Способ по любому из пп.26-33, в котором культуральная среда содержит по меньшей мере 7 мг/л никотинамида (витамина В3).

35. Способ по любому из пп.26-34, в котором буфер для диафильтрации содержит по меньшей мере 5 мкМ цинка и по меньшей мере 2 мМ кальция.

36. Способ по любому из пп.26-35, в котором белок ADAMTS представляет собой ADAMTS13.

37. Способ по п.36, в котором потери удельной активности ADAMTS13 составляют менее чем 20% в период с конца стадии (c) до конца стадии (e).

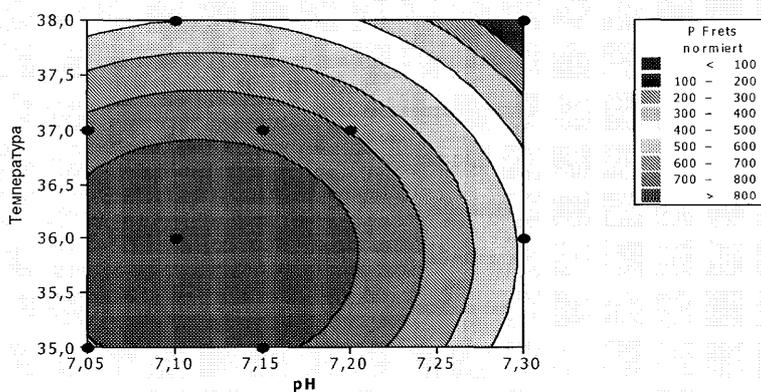
38. Способ по п.36, в котором потери удельной активности ADAMTS13 составляют менее чем 10% в период с конца стадии (c) до конца стадии (e).

39. Способ по любому из пп.36-38, в котором композиция ADAMTS13 имеет удельную активность, составляющую по меньшей мере 1000 единиц/мг белка ADAMTS13.

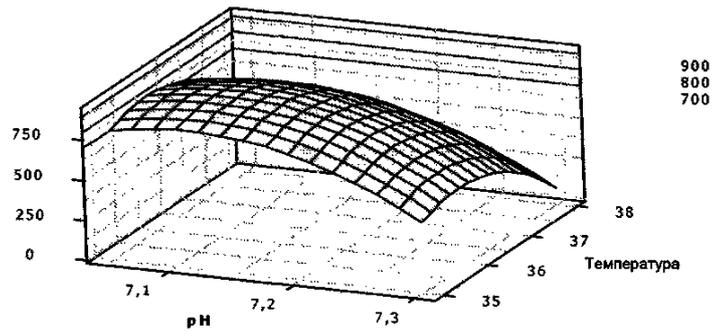
40. Способ по любому из пп.36-38, в котором композиция ADAMTS13 имеет удельную активность, составляющую по меньшей мере 1500 единиц/мг белка ADAMTS13.

41. Способ по любому из пп.1-25, в котором белок ADAMTS13 представляет собой белок ADAMTS13 человека.

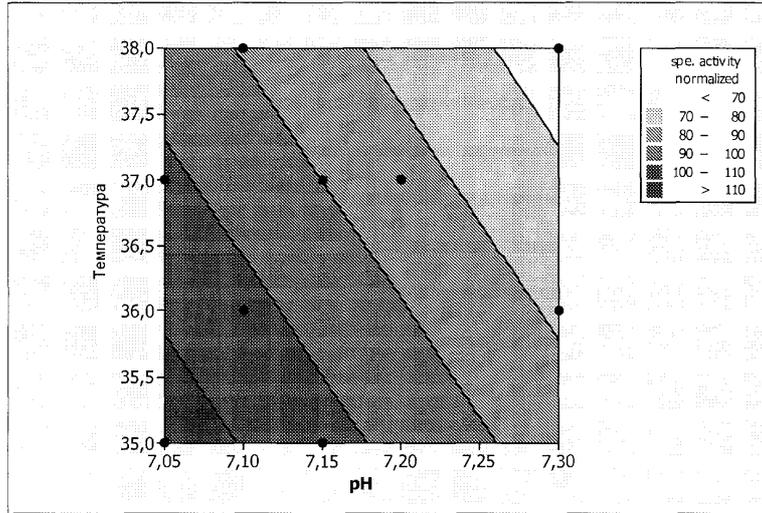
42. Способ по любому из пп.26-40, в котором белок ADAMTS13 представляет собой белок ADAMTS13 человека.



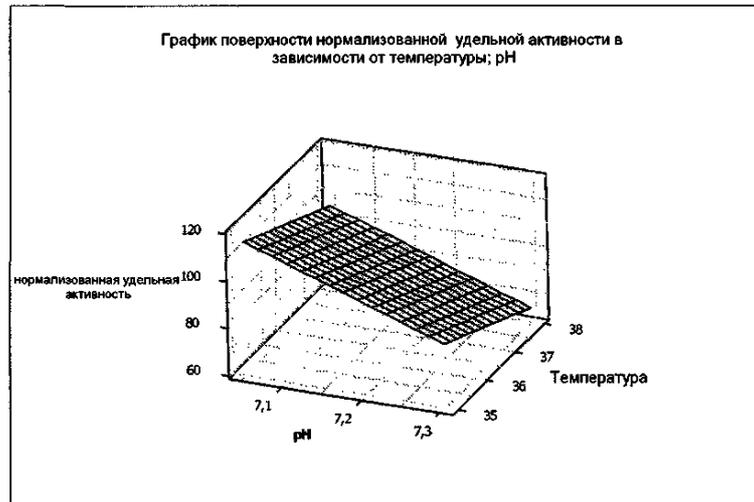
Фиг. 1А



Фиг. 1В



Фиг. 2А



Фиг. 2В