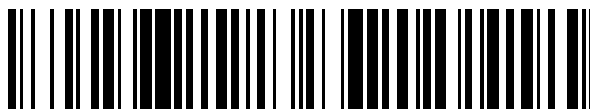


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 692**

51 Int. Cl.:

C07K 14/755 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/37 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2011** **E 16153131 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019** **EP 3064508**

54 Título: **Método de producción de vWF recombinante de alto peso molecular en cultivo celular**

30 Prioridad:

08.07.2010 US 362635 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.05.2020

73 Titular/es:

BAXALTA GMBH (50.0%)
Thurgauerstrasse 130
8152 Glattpark (Opfikon), CH y
BAXALTA INCORPORATED (50.0%)

72 Inventor/es:

GRILLBERGER, LEOPOLD;
REITER, MANFRED y
MUNDT, WOLFGANG

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 761 692 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de producción de vWF recombinante de alto peso molecular en cultivo celular

5 Referencias cruzadas a solicitudes

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense con n.º de serie 61/362.635, presentada el 8 de julio de 2010.

10 Antecedentes de la invención

La expresión recombinante de proteínas terapéuticas en cultivo celular (particularmente cultivos celulares a gran escala), incluyendo el cultivo celular eucariota, y más específicamente el cultivo celular de mamífero, requiere el uso de medios de cultivo especiales que proporcionen sustancias nutritivas para el crecimiento eficaz de las células. Las formulaciones de medios de cultivo celular a menudo se complementan con una variedad de aditivos, incluyendo suero bovino fetal (FCS), proteínas derivadas de animales y/o hidrolizados de proteínas de origen bovino así como hidrolizados de proteínas derivados de plantas o levaduras. Un reto con tales cultivos es que la cantidad de proteína y la actividad total y específica de la proteína producida a menudo son variables a través de diferentes cultivos celulares, incluso cuando no se cambia la formulación para los medios de cultivo celular. Esta variabilidad es especialmente evidente en el caso de los procedimientos de fabricación a gran escala que utilizan volúmenes de cultivo celular de 10 litros a más de 20 000 litros. Medios de cultivo celular que contienen hidrolizados son particularmente propensos a variabilidad de un cultivo celular al siguiente, lo que conduce a la producción disminuida de la proteína total, así como a una actividad total y específica disminuidas.

Un posible motivo para la variabilidad a través de diferentes cultivos celulares es que los contaminantes en aditivos tales como hidrolizados varían de un lote al siguiente. En general, el suero o las sustancias derivadas de suero, tales como, por ejemplo, albúmina, transferrina o insulina, pueden comprender agentes no deseados que pueden contaminar los cultivos celulares y los productos biológicos obtenidos de ellos. Además, los aditivos derivados de suero humano tienen que someterse a prueba para todos los virus conocidos, incluyendo virus de la hepatitis y VIH que pueden transmitirse a través del suero. Además, el suero bovino y productos derivados del mismo conllevan el riesgo de contaminación por BSE. Además, todos los productos derivados del suero pueden contaminarse por sustancias desconocidas. Cuando se usan aditivos de proteína o suero derivados de fuentes humanas o animales en cultivo celular, hay numerosos problemas (por ejemplo, la calidad variable en la composición de los diferentes lotes y el riesgo de contaminación con micoplasma, virus o BSE), particularmente si las células se usan en la fabricación de fármacos o vacunas para la administración humana. Por tanto, se han realizado muchos intentos para proporcionar condiciones de cultivo y sistemas huésped eficaces, que no requieren suero ni otros compuestos proteicos animales.

Tales medios libres de suero se han desarrollado basándose en extractos de proteínas derivados de plantas o levaduras. Por ejemplo, se sabe que los hidrolizados de soja son útiles para los procedimientos de fermentación y pueden potenciar el crecimiento de muchos organismos, levaduras y hongos de cultivo difícil. El documento WO 96/26266 describe que los digestos con papaína de harina de soja constituyen una fuente de hidratos de carbono y nitrógeno y muchos de los componentes pueden usarse en cultivo tisular. Franek *et al.* (Biotechnology Progress (2000) 16, 688-692) describen efectos que promueven el crecimiento y la productividad de fracciones peptídicas de hidrolizado de trigo y soja definidas.

El documento WO 96/15231 divulga un medio libre de suero compuesto por un medio esencial mínimo sintético y un extracto de levadura para la propagación de células de vertebrados y un procedimiento de producción de virus. En el documento WO 98/15614 se divulga una formulación de medio compuesta por un medio de cultivo celular basal que comprende un péptido de arroz y un extracto de levadura y un digesto enzimático del mismo, y/o un lípido vegetal para el crecimiento de células animales. En el documento WO 01/23527 se divulga un medio que comprende hidrolizado de soja purificado para el cultivo de células recombinantes. El documento WO 00/03000 divulga un medio que comprende un hidrolizado de soja y un extracto de levadura, pero también requiere la presencia de formas recombinantes de proteínas animales, tales como factores de crecimiento.

El documento EP-A-0 481 791 describe un medio de cultivo definido bioquímicamente para cultivar células CHO obtenidas por ingeniería genética, que está libre de proteínas, lípidos e hidratos de carbono, aislado de una fuente animal, que comprende además una insulina recombinante o análogo de insulina, putrescina y peptona de soja digeridas por papaína a del 1 % al 0,025 % p/v. El documento WO 98/08934 describe un cultivo celular eucariota libre de suero que comprende péptidos de soja hidrolizados (1-1000 mg/l), putrescina de 0,01 a 1 mg/l y una variedad de componentes derivados de animales, incluyendo albúmina, fetuina, diversas hormonas y otras proteínas. En este contexto, debe indicarse que también se sabe que la putrescina está comprendida en medios convencionales como DMEM/F12 de Ham en una concentración de 0,08 mg/l.

Sin embargo, los hidrolizados de plantas y/o levaduras son mezclas indefinidas de oligopéptidos y otros componentes y contaminantes desconocidos. Además, la calidad de los lotes de hidrolizados disponibles

comercialmente varía extremadamente. Como resultado, hay grandes variaciones en la producción de proteínas recombinantes o productos virales (una variación de hasta un factor de tres) en función de los lotes hidrolizados usados ("variación de un lote a otro"). Este inconveniente afecta a la proliferación de las células, así como a la expresión de proteínas de cada célula. El documento US 2007/0212770 describe diversos medios de cultivo definidos químicamente, libres de oligopéptidos y libres de proteínas animales que son útiles para la producción a gran escala de productos biofarmacéuticos proteicos recombinantes.

La hemostasia implica la interacción de diversas vías de reacción hemostáticas que conducen finalmente a la formación de un trombo. Los trombos son depósitos de hemoderivados sobre la superficie de la pared vascular que consisten principalmente en plaquetas sanguíneas agregadas y fibrina reticulada insoluble. La formación de fibrina es el resultado de la proteólisis restringida de fibrinógeno por trombina, una enzima de coagulación. La trombina es el producto final de la cascada de coagulación, una sucesión de activaciones de zimógeno que se producen sobre las superficies de plaquetas y leucocitos sanguíneos activados, y una variedad de células vasculares (para su estudio, véase K. G. Mann *et al.*, Blood, 1990, Vol. 76, págs. 1-16).

Una función importante en la cascada de coagulación reside en la activación del factor X por el complejo de factor IX activado (factor IXa) y factor VIII activado (factor VIIIa). Una deficiencia o una disfunción de los componentes de este complejo está asociada con la enfermedad de la sangre conocida como hemofilia (J. E. Sadler & E. W. Davie: Hemophilia A, Hemophilia B, and von Willebrand's Disease, en G. Stamatoyannopoulos *et al.*, (Eds.): The molecular basis of the blood diseases. W.B. Saunders Co., Filadelfia, 1987, págs. 576-602). La hemofilia A está relacionada con una deficiencia de la actividad del Factor VIII, mientras que la hemofilia B se refiere a una deficiencia del factor IX. El tratamiento actual consiste en una terapia de sustitución usando preparaciones farmacéuticas que comprenden el factor de coagulación normal. De estas trombopatías, la hemofilia A se produce con más frecuencia, afectando aproximadamente a uno de 10 000 hombres. La terapia de sustitución en pacientes con hemofilia A implica la administración repetida de preparaciones que contienen factor VIII normal mediante infusión intravenosa. El intervalo entre infusiones es una función de la degradación de la actividad del factor VIII en la circulación sanguínea. La semivida de la actividad del factor VIII tras una infusión difiere de un individuo a otro, oscilando entre 10 y 30 horas. Por tanto, una terapia profiláctica requiere una infusión cada de dos a tres días. Esto constituye una pesada carga en la vida de los pacientes hemofílicos, en particular, si el acceso venoso ha sido difícil debido a la cicatrización local tras pinchazos de aguja frecuentes para infusiones intravenosas.

Sería particularmente ventajoso si la frecuencia de las infusiones pudiera disminuirse usando factor VIII que tuviera semividas prolongadas. Se conoce bien en la técnica que la semivida del heterodímero de factor VIII no activado depende fuertemente de la presencia de factor de von Willebrand, que muestra una fuerte afinidad por el factor VIII (sin embargo, no por el factor VIIIa) y sirve como proteína portadora (J. E. Sadler y E. W. Davie: Hemophilia A, Hemophilia B and von Willebrand's disease, en G. Stamatoyannopoulos *et al.* (Eds.): The molecular basis of blood diseases. W.B. Saunders Co., Filadelfia, 1987, págs. 576-602). Se sabe que los pacientes que padecen enfermedad de von Willebrand de tipo 3, que no tienen un factor de von Willebrand detectable en su circulación sanguínea, también padecen una deficiencia de factor VIII secundaria. Además, la semivida del factor VIII administrado por vía intravenosa en esos pacientes es de 2 a 4 horas, que considerablemente es más corto que de 10 a 30 horas observado en pacientes con hemofilia A. A partir de estos hallazgos resulta que el factor VIII tiende a un aclaramiento rápido de la circulación sanguínea y que este proceso se inhibe hasta cierto punto por la complejación con su portador natural, el factor de von Willebrand.

El factor de von Willebrand (vWF) es una glucoproteína que circula en plasma como una serie de multímeros que normalmente oscilan en tamaño entre aproximadamente 500 y 20 000 kD (o entre 2 y 40 dímeros de vWF). Los dímeros y formas multiméricas de vWF están compuestos por subunidades polipeptídicas de 250 kD unidas entre sí mediante puentes disulfuro. El vWF media la adhesión plaquetaria inicial al subendotelio de la pared del vaso dañado; presentando también sólo los multímeros más grandes actividad hemostática. El vWF multimerizado se une a la glucoproteína Gp1b α de la superficie de las plaquetas, a través de una interacción en el dominio A1 del vWF, con el fin de facilitar la adhesión plaquetaria. Se supone que las células endoteliales secretan formas poliméricas grandes de vWF y que estas formas de vWF que tienen un bajo peso molecular (vWF de bajo peso molecular) han surgido de la escisión proteolítica. Los multímeros que tienen grandes masas moleculares se almacenan en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales y se liberan tras estimulación.

La reducción de la actividad de unión de FVIII, debido o bien a los niveles reducidos de proteína vWF o bien a la afinidad de unión disminuida de FVIII, da como resultado uno de tres tipos de enfermedad de von Willebrand. Además de, o alternativamente, determinados tipos de enfermedad de von Willebrand se caracterizan por un aumento o una disminución en el nivel de la asociación de plaquetas mediada por Gp1b α , concretamente en los tipos 2A, 2B y 2M (resumido en Castaman *et al.*, Disorders of Hemostasis 88(1):94-108 (2003)). Como tal, la modulación de las interacciones del vWF tanto con FVIII como con Gp1b α es una estrategia viable para el tratamiento tanto de la hemofilia como de la enfermedad de von Willebrand.

Dada la importancia biológica del vWF, hay una necesidad constante en la técnica de mejorar los modos para producir vWF para aplicaciones terapéuticas. Se sabe bien que el vWF puede aislarse de fuentes endógenas, tales como plasma sanguíneo humano. El vWF aislado es ventajoso porque tiene una alta actividad específica para llevar

a cabo su función biológica y, por tanto, puede usarse eficazmente como una proteína terapéutica para tratar enfermedades relacionadas, tal como la enfermedad de von Willebrand. Normalmente, el vWF plasmático tiene una actividad de ristocetina específica de aproximadamente 100 mU/ μ g, pero el aislamiento del plasma sanguíneo humano tiene desventajas porque, por ejemplo, el plasma puede contener una variedad de virus, tales como VIH y/o virus de hepatitis, que pueden transferirse al paciente. Además, el plasma es un recurso limitado y, por tanto, la escasez de plasma puede ser problemática a la hora de proporcionar suficiente vWF para el tratamiento. Como tal, los métodos recombinantes para producir vWF son ventajosos cuando se abordan algunos de los problemas asociados con basarse en plasma como fuente para el vWF. Para la producción recombinante, se clonó la longitud completa del ADNc de vWF; el propolipéptido corresponde a los residuos de aminoácido 23 a 764 del prepro-vWF de longitud completa (Eikenboom *et al* (1995) *Haemophilia* 1, 77-90).

Desgraciadamente, el vWF es una molécula con modificaciones postraduccionales complejas. Además, la multimerización de los dímeros de vWF para dar multímeros grandes y ultra grandes en el aparato de Golgi supone un reto para la expresión en células de mamífero. Por ejemplo, el vWF de alto peso molecular expresado en cultivo celular de, por ejemplo, células endoteliales humanas (primarias) depende del almacenamiento específico de moléculas de vWF ultragrandes en cuerpos de Weibel-Palade. Tales cultivos celulares no son adecuados para la producción de proteínas terapéuticas. Se han notificado otros métodos de cultivo celular, y se sabe que las condiciones del cultivo celular pueden afectar a la producción del vWF de varios modos. Por ejemplo, se ha demostrado que altas concentraciones de amonio (NH_4^+) alteran las modificaciones postraduccionales. Mayadas *et al.* (J. Biol. Chem., 264(23):13497-13503, 1989) demostraron que niveles de amonio 25 mM daban como resultado la multimerización de vWF reducida en células endoteliales, lo que también afecta negativamente a la actividad de ristocetina específica del vWF recombinante. La reducción de la multimerización generalmente está asociada con la reducción de la actividad, particularmente de la actividad de ristocetina específica, del vWF recombinante.

Todavía sigue siendo difícil predecir qué parámetros pueden afectar positiva o negativamente a la producción de una proteína particular, especialmente glucoproteínas complejas como el factor VIII y vWF. Por ejemplo, se ha demostrado que determinados componentes de un medio de cultivo celular afectan a la producción de factor VIII. Tal como se divulga en la patente estadounidense n.º 5.804.420, la adición de poliol, cobre y otros metales traza puede afectar positivamente al rendimiento de producción de factor VIII. En el documento WO 2009/086309 también se describen procedimientos de cultivo celular usando cobre que se ha demostrado que mejoran la producción de factor VIII. Mignot *et al.* (1989) también han notificado la expresión de vWF en células CHO recombinantes. Sin embargo, ninguno de estos ejemplos proporciona información con respecto a la actividad específica de vWF o su distribución multimérica.

Las proteínas ADAMTS (una desintegrina y metaloproteinasas con motivos de trombospondina de tipo I) son una familia de metaloproteinasas que contienen varios dominios conservados, incluyendo un dominio catalítico dependiente de cinc, un dominio rico en cisteína, un dominio similar a desintegrina y al menos una y en la mayoría de los casos múltiples repeticiones de trombospondina de tipo I (para una revisión, véase Nicholson *et al.*, BMC Evol Biol. 4 de febrero de 2005;5(1):11). Estas proteínas, que están relacionadas evolutivamente con las familias ADAM y MMP de metaloproteinasas (Jones GC, Curr Pharm Biotechnol. Febrero de 2006;7(1):25-31), son enzimas secretadas que se han asociado con varias enfermedades y estados incluyendo la púrpura trombocitopática trombótica (TTP) (Moake JL, Semin Hematol. Enero de 2004;41(1):4-14), trastornos del tejido conjuntivo, cánceres, inflamación (Nicholson *et al.*) y malaria grave por *Plasmodium falciparum* (Larkin *et al.*, PLoS Pathog. Marzo de 2009;5(3):e1000349). Debido a estas asociaciones, las enzimas ADAMTS se han reconocido como posibles dianas terapéuticas para varias patologías (Jones GC, Curr Pharm Biotechnol. Febrero de 2006;7(1):25-31). Por consiguiente, se necesitan métodos de producción de grandes rendimientos de proteínas ADAMTS que tengan altas actividades específicas, que estén libres de contaminantes tales como virus, BSE y patógenos como bacterias *Mycoplasma*.

Un miembro de la familia ADAMTS, ADAMTS13, escinde el factor de von Willebrand (vWF) entre los residuos de Tyr 1605 y Met 1606, una función responsable de la degradación de grandes multímeros de vWF *in vivo*. La pérdida de actividad de ADAMTS 13 se ha asociado con varios estados, tales como TTP (Moake JL, Semin Hematol. Enero de 2004;41(1):4-14), inflamación aguda y crónica (Chauhan *et al.*, J Exp Med. Septiembre de 2008 1;205(9):2065-74), y más recientemente, malaria grave por *Plasmodium falciparum* (Larkin *et al.*, PLoS Pathog. Marzo de 2009;5(3):e1000349).

La proteasa ADAMTS 13 es una proteína glucosilada de 190 kDa producida predominantemente por el hígado (Levy *et al.*, Nature. 2001; 413:488-494; Fujikawa *et al.*, Blood. 2001; 98:1662-1666; Zheng *et al.*, J Biol Chem. 2001; 276:41059-41063; Soejima *et al.*, J Biochem (Tokyo). 2001; 130:475-480; y Gerritsen *et al.*, Blood. 2001; 98:1654-1661). De manera muy similar a los multímeros de rVWF de orden superior, la expresión recombinante de la gran ADAMTS13 en cultivo celular de mamífero presenta muchos retos.

Por tanto, existe la necesidad de proporcionar condiciones de cultivo celular, particularmente condiciones de cultivo de fabricación a gran escala, que proporcionen rendimiento de proteína total sistemático y/o actividad total y específica sistemática de las proteínas producidas entre diferentes cultivos celulares. La regularidad entre cultivos en procedimientos de fabricación a gran escala es importante en la fabricación de proteínas terapéuticas. También

existe la necesidad de condiciones de cultivo celular para la producción a gran escala de rvWF con una distribución multimérica y actividad de ristocetina específica comparable o superior a la del vWF tal como está presente en el plasma humano normal. De manera similar, puesto que las proteínas ADAMTS se han implicado en varias enfermedades y estados, existe la necesidad en la técnica de métodos de producción a gran escala de proteínas ADAMTS recombinantes que tienen altas actividades específicas, que son adecuadas para la formulación y administración farmacéuticas. La presente invención satisface estas y otras necesidades en la técnica para la producción de factor de von Willebrand recombinante.

Breve resumen de invención

En determinados aspectos, la presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que la complementación de medios de cultivo celular usados para expresar factor de von Willebrand recombinante (rvWF) da como resultado la expresión de proteínas y la actividad enzimática significativamente mejoradas.

En un primer aspecto, la presente divulgación proporciona un método para producir una composición de factor de von Willebrand recombinante (rvWF), comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar medios de cultivo celular basales; (b) complementar los medios de cultivo celular basales con cobre para proporcionar una concentración de cobre final de al menos 2,4 µg/l; (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica para una proteína rvWF; (d) cultivar la una o más células en los medios de cultivo celular complementados con cobre de manera que el rvWF se expresa en y se excreta de las células en un sobrenadante de cultivo, y en el que el contenido de NH_4^+ del sobrenadante de cultivo se mantiene a una concentración por debajo de 4 mM; y (e) recuperar al menos una parte del sobrenadante de cultivo, en el que el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rvWF de al menos 30 mU/µg de rvWF.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el método comprende además una etapa de complementar los medios de cultivo celular basales con un hidrolizado antes de cultivar la una o más células.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el hidrolizado es un hidrolizado de plantas. En una realización específica, el hidrolizado es un hidrolizado de soja.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, los medios de cultivo celular basales son medios de cultivo libres de proteínas animales.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, los medios de cultivo celular basales son medios de cultivo libres de proteínas.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, los medios de cultivo celular basales son medios definidos químicamente.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la concentración de cobre final de los medios de cultivo celular basales complementados con cobre es de al menos 4 µg/l de cobre.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la concentración de cobre final de los medios de cultivo celular basales complementados con cobre es de entre 2,4 µg/l y 20 µg/l de cobre.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el cobre que complementa los medios de cultivo celular basal se proporciona como una sal de cobre, un quelato de cobre, o una combinación de los mismos.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la sal de cobre se selecciona del grupo que consiste en sulfato de cobre, acetato de cobre, carbonato de cobre, cloruro de cobre, hidróxido de cobre, nitrato de cobre y óxido de cobre.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la una o más células son células de mamífero. En una realización específica, las células de mamífero son células CHO.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, cultivar la una o más células comprende el cultivo discontinuo de las células.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, cultivar la una o más células comprende el cultivo continuo de células. En una realización específica, el cultivo continuo de células se realiza en modo quimiostático. En otra realización específica, el cultivo continuo de células se realiza en modo de perfusión.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la una o más células se cultivan en al menos 100 l de los medios de cultivo celular basales complementados.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la densidad celular se mantiene a menos de

2,5 × 10⁶ células por ml durante la etapa de cultivar la una o más células.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la densidad celular se mantiene a menos de 2,0 × 10⁶ células por ml durante la etapa de cultivar la una o más células.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la densidad celular se mantiene a menos de 1,5 × 10⁶ células por ml durante la etapa de cultivar la una o más células.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la etapa de recuperar al menos una parte del sobrenadante de cultivo comprende filtración o centrifugación para retirar células de la parte del sobrenadante de cultivo.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rVWF de al menos 40 mU/μg de rVWF. En una realización específica, el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rVWF de al menos 50 mU/μg de rVWF. En una realización más específica, el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rVWF de al menos 60 mU/μg de rVWF. En una realización más específica el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rVWF de al menos 70 mU/μg de rVWF. Aún en una realización más específica, el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rVWF de al menos 80 mU/μg de rVWF.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, al menos el 10 % del rVWF en el sobrenadante está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En una realización específica, al menos el 15 % del rVWF está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra realización específica, al menos el 20 % del rVWF está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra realización específica, al menos el 25 % del rVWF está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra realización específica, al menos el 30 % del rVWF está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el sobrenadante contiene multímeros de vWF de alto peso molecular de 14 a 22 dímeros.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, rVWF se coexpresa con factor VIII recombinante (rFVIII). En una realización específica, el método comprende además una etapa de purificación de rVWF de desde al menos el 50% del rVWF presente en el sobrenadante recuperado. En una realización, la razón de rVWF con respecto a rFVIII después de la etapa de purificación es de al menos 10:1.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el método comprende además una etapa de enriquecimiento de rVWF.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición de factor de von Willebrand recombinante (rVWF) preparada mediante un método proporcionado en el presente documento.

En una realización de las composiciones proporcionadas anteriormente, la composición comprende además factor VIII recombinante (rFVIII). En una realización específica, la razón de rVWF con respecto a rFVIII es de al menos 10:1.

En una realización de las composiciones proporcionadas anteriormente, la composición se formula para administración farmacéutica. En una realización específica, la composición se formula para administración intravenosa.

En un tercer aspecto, la presente divulgación proporciona un sobrenadante de cultivo celular que comprende factor de von Willebrand recombinante (rVWF), en el que el sobrenadante se prepara mediante un método proporcionado en el presente documento.

En un cuarto aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende factor de von Willebrand recombinante (rVWF), en la que al menos el 20% del rVWF en la composición está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra realización específica, al menos el 25% del rVWF en la composición está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra realización específica, al menos el 30% del rVWF en la composición está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En aún otra realización específica de la composición proporcionada anteriormente, la composición se prepara según un método proporcionado en el presente documento.

En un quinto aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende factor de von Willebrand recombinante (rVWF) que tiene una actividad específica de cofactor de ristocetina de al menos 80 mU/μg, y

composición que puede obtenerse mediante un método tal como se define adicionalmente en las reivindicaciones.

En un sexto aspecto, la presente divulgación proporciona un método para producir una composición de ADAMTS13 recombinante (rA13), comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar medios de cultivo celular basales; (b) complementar los medios de cultivo celular basales con cobre para proporcionar una concentración de cobre final de al menos 1,0 µg/l; (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica para una proteína rA13; (d) cultivar la una o más células en los medios de cultivo celular complementados con cobre de manera que rA13 se expresa en y se excreta de las células en un sobrenadante de cultivo; y (e) recuperar al menos una parte del sobrenadante de cultivo, en el que están presentes al menos 1500 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, los medios de cultivo celular basales son medios de cultivo libres de proteínas animales.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, los medios de cultivo celular basales son medios de cultivo libres de proteínas.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, los medios de cultivo celular basales son medios definidos químicamente.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la concentración de cobre final de los medios de cultivo celular basales complementados con cobre es de al menos 1 µg/l de cobre.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la concentración de cobre final de los medios de cultivo celular basales complementados con cobre es de al menos 2 µg/l de cobre.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la concentración de cobre final de los medios de cultivo celular basales complementados con cobre es de al menos 4 µg/l de cobre.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la concentración de cobre final de los medios de cultivo celular basales complementados con cobre es de entre 1 µg/l y 6 µg/l de cobre.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la concentración de cobre final de los medios de cultivo celular basales complementados con cobre es de entre 2 µg/l y 4 µg/l de cobre.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el cobre que complementa los medios de cultivo celular basal se proporciona como una sal de cobre, un quelato de cobre, o una combinación de los mismos. En una realización específica, la sal de cobre se selecciona del grupo que consiste en sulfato de cobre, acetato de cobre, carbonato de cobre, cloruro de cobre, hidróxido de cobre, nitrato de cobre y óxido de cobre.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la una o más células son células de mamífero. En una realización específica, las células de mamífero son células CHO.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, cultivar la una o más células comprende el cultivo discontinuo de las células.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, cultivar la una o más células comprende el cultivo continuo de células. En una realización específica, el cultivo continuo de células se realiza en modo quimiostático. En otra realización específica, el cultivo continuo de células se realiza en modo de perfusión.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la una o más células se cultivan en al menos 100 l de los medios de cultivo celular basales complementados.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la densidad celular se mantiene a menos de $4,0 \times 10^6$ células por ml durante la etapa de cultivar la una o más células.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la densidad celular se mantiene a menos de $3,5 \times 10^6$ células por ml durante la etapa de cultivar la una o más células.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la densidad celular se mantiene a menos de $3,0 \times 10^6$ células por ml durante la etapa de cultivar la una o más células.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la densidad celular se mantiene a menos de $2,5 \times 10^6$ células por ml durante la etapa de cultivar la una o más células.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la densidad celular se mantiene a menos de $2,0 \times 10^6$ células por ml durante la etapa de cultivar la una o más células.

- 5 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la densidad celular se mantiene a menos de $1,5 \times 10^6$ células por ml durante la etapa de cultivar la una o más células.

10 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la etapa de recuperar al menos una parte del sobrenadante de cultivo comprende filtración o centrifugación para retirar células de la parte del sobrenadante de cultivo.

15 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, están presentes al menos 2000 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, están presentes al menos 2500 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado.

20 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el sobrenadante recuperado tiene una actividad mediante FRETs-vWF73 específica de rA13 de al menos 800 mU/ μ g.

25 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el sobrenadante recuperado tiene una actividad mediante FRETs-vWF73 específica de rA13 de al menos 1200 mU/ μ g.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el sobrenadante recuperado tiene una actividad mediante FRETs-vWF73 específica de rA13 de al menos 1600 mU/ μ g.

30 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el contenido de NH_4^+ del sobrenadante de cultivo se mantiene a una concentración por debajo de 10 mM.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el contenido de NH_4^+ del sobrenadante de cultivo se mantiene a una concentración por debajo de 5 mM.

35 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el contenido de NH_4^+ del sobrenadante de cultivo se mantiene a una concentración por debajo de 4 mM.

40 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el método comprende además una etapa de enriquecimiento de rA13.

En un séptimo aspecto, la presente divulgación proporciona un sobrenadante de cultivo celular que comprende ADAMTS13 recombinante (rA13), en el que el sobrenadante se prepara mediante un método proporcionado en el presente documento.

45 En un octavo aspecto, la presente divulgación proporciona un sobrenadante de cultivo celular que comprende factor de von Willebrand recombinante (rvWF), en el que el sobrenadante contiene al menos 5 U de actividad mediante FRETs-vWF73 por ml. En una realización específica, el sobrenadante contiene al menos 6 U de actividad mediante FRETs-vWF73 por ml. En otra realización específica, el sobrenadante contiene al menos 7 U de actividad mediante FRETs-vWF73 por ml. En otra realización específica, el sobrenadante contiene al menos 8 U de actividad mediante FRETs-vWF73 por ml. En otra realización específica, el sobrenadante contiene al menos 9 U de actividad mediante FRETs-vWF73 por ml. En otra realización específica, el sobrenadante contiene al menos 10 U de actividad mediante FRETs-vWF73 por ml. En aún otra realización específica de los sobrenadantes proporcionados anteriormente, el sobrenadante se prepara según un método proporcionado en el presente documento.

55 En un noveno aspecto, la presente divulgación proporciona un sobrenadante de cultivo celular que comprende factor de von Willebrand recombinante (rvWF), en el que el sobrenadante contiene al menos 2 μ g de rA13 por ml. En una realización específica, el sobrenadante contiene al menos 3 μ g de rA13 por ml. En otra realización específica, el sobrenadante contiene al menos 4 μ g de rA13 por ml. En otra realización específica, el sobrenadante contiene al menos 5 μ g de rA13 por ml. En otra realización específica, el sobrenadante contiene al menos 6 μ g de rA13 por ml. En aún otra realización específica de los sobrenadantes proporcionados anteriormente, el sobrenadante se prepara según un método proporcionado en el presente documento.

65 En un décimo aspecto, la presente divulgación proporciona una composición de ADAMTS13 (rA13) recombinante preparada mediante un método según uno cualquiera de los métodos descritos anteriormente.

En una realización de las composiciones proporcionadas anteriormente, la composición se formula para administración farmacéutica. En una realización específica, la composición se formula para administración intravenosa.

5 Breve descripción de los dibujos

Figura 1. (1A) Electroforesis en gel de agarosa (al 1 %) de baja resolución de rvWF expresado en cultivo celular de mamífero en presencia de concentración de cobre baja (1,0 µg/l) y alta (4,3 µg/l), tal como se describe en el ejemplo 2. Obsérvese que el día 3 de cultivo es equivalente al día 1 de lote de la tabla 7 y la tabla 8. (1B) Las cantidades relativas de multímeros de vWF que tienen de 1 a 10 dímeros (número de banda 1) y más de 10 dímeros (número de banda 2), tal como se indica por las bandas definidas en la figura 1A, se cuantificaron mediante análisis densitométrico.

Figura 2. (2A) Diagrama de intervalos de la actividad específica de rvWF promedio presente en sobrenadantes de cultivo celular de rvWF crecido a densidades celulares altas y bajas en presencia de niveles altos o bajos de cobre. (2B) Diagrama de intervalos de la concentración de NH_4^+ promedio encontrada en sobrenadantes de cultivo celular de rvWF crecido a densidades celulares altas y bajas en presencia de niveles altos o bajos de cobre.

Figura 3. Se investigaron sobrenadantes de cultivos celulares que expresan ADAMTS13 recombinante en presencia de niveles crecientes de cobre mediante análisis de SDS-PAGE. Se visualizó rA13 tras SDS-PAGE mediante (3A) tinción con plata y (3B) inmunotransferencia de tipo Western anti-A13.

Figura 4. Diagrama de datos de la productividad volumétrica (P Frets) frente a concentración de cobre que muestra una extrapolación (línea continua) del efecto de la concentración de cobre óptima sobre la productividad de rA13.

Figura 5A-K. Gráficos de barras de cultivos celulares de suspensión continua (quimiestato) que expresan rA13 a lo largo de un tiempo de cultivo de 8 semanas que compara los efectos de los niveles basales de cobre (0,66 µg/l) con los de cultivos complementados hasta una concentración final de 2 µg/l de cobre. Cada barra representa los datos medios de una semana de cultivo quimioestático. La leyenda se refiere a la semana particular presentada en los datos.

Figura 6. (6A) Electroforesis en gel de agarosa (al 1 %) de baja resolución de rvWF expresado en cultivo celular de mamífero en presencia de concentración de cobre baja (1,0 µg/l) y alta (4,3 µg/l) a densidades celulares altas y bajas tal como se describe en el ejemplo 3. Obsérvese que los días 8 y 17 de cultivo ("CST8" y "CST17") son equivalentes al día 8 y el día 17 de la tabla 10 a la tabla 13. (6B) Las cantidades relativas de multímeros de vWF que tienen de 1 a 10 dímeros y más de 10 dímeros, tal como se indica por las bandas definidas en la figura 6A, se cuantificaron mediante análisis densitométrico.

Descripción detallada de invención

I. Introducción

rvWF recombinante (rvWF) y ADAMTS13 recombinante (rA13) pueden producirse mediante la expresión de cultivos celulares de mamífero a gran escala. Sin embargo, la actividad de estas proteínas cuando se producen usando condiciones de cultivo celular convencionales a menudo varía de unos cultivos celulares a otros, incluso cuando no se cambian las formulaciones generales de los medios, y a menudo las actividades específicas de las proteínas recombinantes no son iguales a las de vWF y rA13 derivadas de plasma sanguíneo. Además, rvWF expresado en cultivos celulares de mamífero tiende a producir composiciones de proteína con bajos porcentajes (inferiores al 10 %) de multímeros de orden superior (los multímeros de orden superior incluyen moléculas que contienen más de 10 dímeros de vWF). Estos inconvenientes en los métodos de producción convencionales de rvWF y rA13 son particularmente problemáticos cuando se desarrollan cultivos para la producción a gran escala (es decir, cultivos de desde 10 hasta más de 20 000 litros).

Una posible fuente de variabilidad observada a menudo en diferentes lotes de cultivo celular es la presencia de contaminantes de los medios de cultivo celular. Estos contaminantes pueden estar presentes en diferentes cantidades en diferentes lotes, lo que conduce a resultados variables en la producción de rvWF y rA13. Tras investigar los diferentes contaminantes encontrados en diversos aditivos de medios de cultivo celular, los presentes inventores encontraron que la presencia de hidrolizados conduce a variación en las concentraciones de cobre en los medios celulares. Una investigación adicional proporcionó el resultado sorprendente de que la complementación con concentraciones de cobre de los medios celulares hasta producir una concentración de cobre total de al menos aproximadamente 2,4 µg/l aumentaba de manera sistemática la actividad total y específica de rvWF y/o también podría conducir a un rendimiento de proteína total aumentado. Por tanto, la presente invención proporciona métodos y composiciones para la producción de alto rendimiento de proteínas rvWF con alta actividad específica.

En un aspecto, la presente invención proporciona composiciones que comprenden rvWF con actividad que es

comparable a o mayor que la observada con vWF derivado de plasma (pdvWF). En aspectos adicionales, las proteínas rvWF producidas según la presente divulgación muestran sistemáticamente mayor actividad que proteínas producidas usando métodos de cultivo celular convencionales en medios que no se han complementado con cobre u otros complementos descritos en mayor detalle en el presente documento. Ventajosamente, en determinadas realizaciones de los métodos y las composiciones proporcionados en el presente documento, las proteínas rvWF producidas según la presente divulgación muestran sistemáticamente actividad específica mayor (es decir, U/mg de proteína) que proteínas producidas usando métodos de cultivo celular convencionales en medios que no se han complementado con cobre u otros complementos descritos en mayor detalle en el presente documento. Asimismo, los métodos proporcionados en el presente documento para la producción de rvWF proporcionan rendimientos de actividad mayores por volumen de cultivo (es decir, U/L/D), en comparación con métodos de cultivo celular convencionales utilizando medios que no se han complementado con cobre u otros complementos descritos en mayor detalle en el presente documento.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona métodos de cultivo celular en los que un medio de cultivo celular basal se complementa con cobre para dar como resultado una concentración total de al menos 2,4 µg/l. En aún otras realizaciones, el medio de cultivo celular basal se complementa con cobre para dar como resultado una concentración total de al menos aproximadamente 2,4 µg/l a aproximadamente 20 µg/l. En algunas realizaciones, la concentración total de cobre es de desde aproximadamente 2,4-4,5 µg/l. En determinadas realizaciones, el medio de cultivo celular se complementa para dar como resultado aproximadamente cobre 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,2, 4,4, 4,6, 4,8, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 µg/l, o más. Los medios de cultivo celular basales generalmente tienen una concentración de cobre traza por debajo de 1 µg/l.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos de cultivo celular en los que un medio de cultivo celular basal se complementa con desde aproximadamente 2,4 µg/l hasta aproximadamente 20 µg/l de cobre para la producción de rvWF. En realizaciones adicionales, el medio de cultivo celular basal se complementa con desde aproximadamente cobre 2,5-8, 3,0-6, 4,0-5,0 µg/l para la producción de rvWF. Todavía en realizaciones adicionales, el medio de cultivo celular basal puede, además de complementarse con cobre, incluir también uno o más hidrolizados.

Todavía en un aspecto adicional y según cualquiera de lo anterior, la presente divulgación proporciona métodos de cultivo celular en los que los niveles de amonio de la disolución de cultivo celular son bajos (por debajo de 4 mM). En determinadas realizaciones, los métodos de cultivo celular de la presente divulgación utilizan medios de cultivo celular que tienen más de cobre 2,4 µg/l en combinación con bajos niveles de amonio.

Una de las ventajas de las composiciones de la presente invención es que son susceptibles a la producción del cultivo celular a gran escala. Estos cultivos celulares a gran escala son cultivos de al menos 10 l, 50 l, 100 l, 150 l, 200 l, 250 l, 500 l, 750 l, 1000 l, 1500 l, 2000 l, 5000 l, 10 000 l o 20 000 litros.

En determinados aspectos, los métodos de la divulgación no dan como resultado necesariamente una cantidad mayor de proteína recombinante global, pero la proteína recombinante (rvWF) que se produce muestra mayor actividad total y específica que la observada en proteínas producidas usando cultivos celulares convencionales, particularmente en comparación con proteínas producidas en cultivos celulares en los que el medio de cultivo celular no se ha complementado con cobre adicional. En aspectos adicionales, las proteínas rvWF producidas en células cultivadas en medios complementados con cobre muestran sistemáticamente actividad aumentada por litro de cultivo celular en comparación con células cultivadas en medios de cultivo celular basales que no se han complementado con cobre. Todavía en aspectos adicionales, los medios complementados con cobre de la presente divulgación dan como resultado un rendimiento de proteína aumentado, un número de células aumentado en el cultivo, y/o una actividad total aumentada por litro de cultivo en comparación con medios que no se han complementado con cobre.

Ventajas todavía adicionales de las composiciones de la invención son que dan como resultado una población de proteínas que contiene un alto porcentaje (más del 20 %) de rvWF altamente multimerizado.

Aunque gran parte de la descripción en el presente documento que se refiere a proteínas ADAMTS es en lo que se refiere a ADAMTS 13 (A13), se apreciará que puesto que todas las proteínas ADAMTS comparten una arquitectura de dominio central común y relaciones de estructura-función comunes, los métodos y las composiciones descritos en el presente documento son aplicables para la producción de cualquier proteína ADAMTS, no sólo rA13.

II. Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, "vWF recombinante" incluye vWF obtenido a través de tecnología de ADN recombinante. En determinadas realizaciones, las proteínas vWF en la invención pueden comprender un constructo, por ejemplo, preparado como en el documento WO 1986/06096 publicado el 23 de octubre de 1986 y la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 07/559.509, presentada el 23 de julio de 1990, en nombre de

Ginsburg *et al.* El vWF en la presente invención puede incluir todas las posibles formas, incluyendo las formas monoméricas y multiméricas. También debe entenderse que la presente invención engloba diferentes formas de vWF que van a usarse en combinación. Por ejemplo, el vWF en la presente invención puede incluir diferentes multímeros, diferentes derivados y tanto derivados biológicamente activos como derivados no biológicamente activos.

El término “recombinante” cuando se usa con referencia, por ejemplo, a una célula, o ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se ha modificado mediante la introducción de una proteína o ácido nucleico heterólogo o mediante la alteración de una proteína o ácido nucleico nativo, o que la célula se deriva de una célula así modificada. Por tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que de otro modo se expresan de manera anómala, se expresan en menor cantidad o no se expresan en absoluto.

En el contexto de la presente invención, el vWF recombinante abarca cualquier miembro de la familia de vWF de, por ejemplo, un mamífero tal como un primate, humano, mono, conejo, cerdo, roedor, ratón, rata, hámster, jerbo, animal canino, animal felino y derivados biológicamente activos del mismo. En una realización preferida, el vWF recombinante es vWF humano. También se abarcan proteínas vWF mutantes y variantes que tienen actividad, como son fragmentos funcionales y proteínas de fusión de las proteínas vWF. Además, el vWF en la invención puede comprender además etiquetas que facilitan la purificación, la detección, o ambas. El vWF descrito en el presente documento puede modificarse adicionalmente con un resto terapéutico o un resto del que se obtienen imágenes de manera adecuada *in vitro* o *in vivo*.

Los términos “vWF altamente multimérico”, “vWF de alto peso molecular” y “vWF HMW” pueden usarse de manera intercambiable y se refieren a multímeros de vWF unidos covalentemente que contienen más de 10 dímeros de vWF. En determinadas realizaciones, vWF HMW contiene al menos 11 dímeros de vWF, o al menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o más dímeros de vWF.

Tal como se usa en el presente documento, una “proteína ADAMTS” se refiere a un polipéptido de la familia de metaloproteinasas de desintegrina y metaloproteinasas con motivos de trombospondina de tipo I. Los miembros de esta familia incluyen las proteínas ADAMTS1 humanas (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), y ADAMTS20 (NM_025003, NM_175851). Las proteínas ADAMTS incluyen tanto proteínas de longitud completa como polipéptidos parciales que muestran al menos actividad biológica parcial, por ejemplo, al menos el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, o más de la actividad demostrada por la proteína de longitud completa, en particular la actividad proteasa demostrada por la proteína de longitud completa. En determinados casos, una proteína ADAMTS se modificará postraducionalmente o bien *in vivo* o bien *in vitro*, por ejemplo, mediante medios enzimáticos o químicos. Se entiende que las proteínas ADAMTS de la presente divulgación incluyen alternativamente isoformas sometidas a corte y empalme, proteínas modificadas de manera conservativa, proteínas sustancialmente idénticas, homólogos y similares.

En el contexto de la presente divulgación, una proteína ADAMTS abarca cualquier miembro de la familia ADAMTS de, por ejemplo, un mamífero tal como un primate, humano, mono, conejo, cerdo, roedor, ratón, rata, hámster, jerbo, animal canino, animal felino, y derivados biológicamente activos del mismo. También se abarcan proteínas ADAMTS mutantes y variantes que tienen actividad, como son fragmentos funcionales y proteínas de fusión de las proteínas ADAMTS. Además, las proteínas ADAMTS de la divulgación pueden comprender además etiquetas que facilitan la purificación, la detección, o ambas. Las proteínas ADAMTS descritas en el presente documento pueden modificarse adicionalmente con un resto terapéutico o un resto del que se obtienen imágenes de manera adecuada *in vitro* o *in vivo*.

Tal como se usa en el presente documento, una “proteína ADAMTS13” se refiere a cualquier proteína o polipéptido con actividad de ADAMTS 13, particularmente la capacidad para escindir el enlace peptídico entre los residuos Tyr-842 y Met-843 de vWF. En una realización a modo de ejemplo, una proteína ADAMTS13 se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es altamente similar a la de NP_620594 (isoforma 1 de ADAMTS13, preproteína) o los aminoácidos del 75 al 1427 de NP_620594 (isoforma 1 de ADAMTS13, polipéptido maduro). En otra realización, una proteína ADAMTS13 se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es altamente similar a la de NP_620596 (isoforma 2 de ADAMTS13, preproteína) o los aminoácidos del 75 al 1371 de NP_620594 (isoforma 2 de ADAMTS13, polipéptido maduro). Aún en otra realización, las proteínas ADAMTS13 incluyen polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos altamente similar a la de NP_620595 (isoforma 3 de ADAMTS 13, preproteína) o los aminoácidos del 75 al 1340 de NP_620595 (isoforma 1 de ADAMTS 13, polipéptido maduro). Tal como se usa en el presente documento, una proteína ADAMTS13 incluye variantes naturales con actividad de escisión de vWF y constructos artificiales con actividad de escisión de vWF. Tal como se usa en la presente divulgación, ADAMTS13 engloba cualquier variante

natural, secuencia alternativa, isoforma o proteína mutante que conserva algo de actividad basal. Los ejemplos de mutaciones de ADAMTS13 encontradas en la población humana incluyen, sin limitación, 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, muchas de las cuales se han encontrado asociadas con la púrpura trombocitopénica trombótica (TTP). Las proteínas ADAMTS13 también incluyen polipéptidos que contienen modificaciones postraduccionales. Por ejemplo, se ha demostrado que ADAMTS13 se modifica mediante N-acetilglucosamina (GlcNAc) en los residuos 614, 667 y 1354, y se ha predicho que los residuos 142, 146, 552, 579, 707, 828 y 1235 también pueden modificarse de este modo.

Puede prepararse ADAMTS13 recombinante proteolíticamente activa mediante la expresión en cultivos celulares de mamífero, tal como se describe en Plaimauer *et al.*, (2002, Blood. 15;100(10):3626-32) y el documento US 2005/0266528. Se divulgan métodos para la expresión de ADAMTS13 recombinante en cultivo celular en Plaimauer B, Scheifflinger F. (Semin Hematol. Enero de 2004;41(1):24-33 y el documento US 2011/0086413.

Tal como se usa en el presente documento, el término “derivado biológicamente activo”, cuando se usa en el contexto de una proteína ADAMTS, también abarca polipéptidos obtenidos a través de tecnología de ADN recombinante. Esta puede incluir cualquier método conocido en la técnica para (i) producir ADN recombinante mediante ingeniería genética, por ejemplo, a través de la transcripción inversa de ARN y/o amplificación de ADN, (ii) introducir ADN recombinante en células procariotas o eucariotas mediante transfección, es decir, a través de electroporación o microinyección, (iii) cultivar dichas células transformadas, por ejemplo, de manera continua o discontinua, (iv) expresar una proteína ADAMTS, por ejemplo, de manera constitutiva o con inducción, y (v) aislar dicha proteína ADAMTS, por ejemplo, del medio de cultivo o recoger las células transformadas, con el fin de (vi) obtener proteína ADAMTS recombinante purificada sustancialmente, por ejemplo, a través de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrofóbica, y similares. El término “derivado biológicamente activo” incluye también moléculas quiméricas tales como por ejemplo una proteína ADAMTS, o fragmento funcional de la misma, en combinación con un segundo polipéptido, por ejemplo, un dominio Fc de inmunoglobulina o un dominio de albúmina, con el fin de mejorar las propiedades biológicas/farmacológicas tales como, por ejemplo, la semivida de la proteína ADAMTS en el sistema circulatorio de un mamífero, particularmente un humano.

Los términos “aislado”, “purificado” o “biológicamente puro” se refieren a material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. La pureza y la homogeneidad normalmente se determinan usando técnicas de química analítica tales como electroforesis en gel de poliácridamida o cromatografía de líquidos de alto rendimiento. En una realización, rvWF es la especie predominante presente en una preparación que está purificada sustancialmente. En otra realización, rA13 es la especie predominante presente en una preparación que está purificada sustancialmente. El término “purificado” en algunas realizaciones indica que un ácido nucleico o proteína da lugar esencialmente a una banda en un gel electroforético. En otras realizaciones, significa que la proteína o el ácido nucleico es puro en al menos el 50 %, más preferiblemente puro en al menos el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o más. “Purificar” o “purificación” en otras realizaciones significa retirar al menos un contaminante de la composición que va a purificarse. En este sentido, purificación no requiere que el compuesto purificado sea homogéneo, ejemplo, puro al 100 %.

La actividad biológica de vWF puede medirse mediante ensayos *in vitro* conocidos. Por ejemplo, el ensayo de cofactor de ristocetina se basa en la aglutinación de plaquetas frescas o fijadas en formalina inducidas por el antibiótico ristocetina en presencia de vWF. El grado de aglutinación de plaquetas depende de la concentración de vWF y puede medirse mediante el método turbidimétrico, por ejemplo, mediante el uso de un agregómetro (Weiss *et al.*, J. Clin. Invest. 52: 2708-2716, 1973; Macfarlane *et al.*, Thromb. Diath. Haemorrh. 34: 306-308, 1975). Tal como se proporciona en el presente documento, la actividad específica del cofactor de ristocetina del vWF en la presente invención se describe en lo que se refiere a mU/ μ g de vWF, tal como se mide usando ensayos *in vitro*.

Tal como se usa en el presente documento, “una unidad de actividad de ADAMTS” se define como la cantidad de actividad en 1 ml de plasma humano normal combinado, independientemente del ensayo que esté usándose. Por ejemplo, cuando la proteína ADAMTS es ADAMTS13, una unidad de actividad mediante FRETS-vWF73 de ADAMTS13 es la cantidad de actividad necesaria para escindir la misma cantidad del sustrato FRETS-vWF73 (Kokame *et al.*, Br J Haematol. Abril de 2005; 129(1):93-100) cuando se escinde por un ml de plasma humano normal combinado. De manera conveniente, la actividad de ADAMTS13 puede determinarse mediante ensayos funcionales, tales como ensayos funcionales que emplean péptidos de factor de von Willebrand modificados como sustrato para ADAMTS13 (Tripodi *et al.* J Thromb Haemost. Septiembre de 2008;6(9): 1534-41). Un método preferido de determinación de la actividad de ADAMTS 13 humana recombinante se divulga en Gerritsen *et al.* (Assay of von Willebrand factor (vWF)-cleaving protease based on decreased collagen binding affinity of degraded vWF: a tool for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). Thromb Haemost 1999; 82: 1386-1389). En una realización, para considerarse como una proteína ADAMTS13 tal como se definió anteriormente, un polipéptido o proteína debe tener al menos un 1 % de la actividad de escisión de vWF de ADAMTS13 nativa. En otras realizaciones, una proteína ADAMTS13 contendrá al menos el 10 % de la actividad de ADAMTS13 nativa. Aún

en otras realizaciones, una proteína ADAMTS13 contendrá al menos el 5 %, el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 % de la actividad de ADAMTS13 nativa. La cantidad de una proteína ADAMTS13 también puede determinarse mediante la medición de un antígeno de ADAMTS13, por ejemplo, usando el método ELISA divulgado en Rieger *et al.*, (2006, Thromb Haemost. 2006 95(2):212-20). Un convenio bien establecido en la técnica es que 1 ml de plasma humano normal combinado contiene 1 µg de ADAMTS13. Por tanto, el convenio en la técnica es que 1 µg de ADAMTS 13 derivado de plasma tiene una unidad de actividad de ADAMTS13.

Los términos “disolución de cultivo celular”, “medio o medios de cultivo celular” y “sobrenadante de cultivo celular” se refieren a aspectos de procedimientos de cultivo celular generalmente bien conocidos en la técnica. En el contexto de la presente invención, una disolución de cultivo celular puede incluir medios de cultivo celular y sobrenadante de cultivo celular. Los medios de cultivo celular se añaden externamente a la disolución de cultivo celular, opcionalmente junto con complementos, para proporcionar nutrientes y otros componentes para cultivar células que expresan rvWF o rA13. El sobrenadante de cultivo celular se refiere a una disolución de cultivo celular que comprende los nutrientes y otros componentes del medio de cultivo celular así como productos liberados, metabolizados y/o excretados de las células durante el cultivo, pero a no las propias células. Por tanto, en un contexto, un sobrenadante de cultivo celular puede referirse a la fase líquida de una disolución de cultivo celular (es decir, la disolución de cultivo celular excluyendo las células). Por ejemplo, la concentración de amonio de un sobrenadante de cultivo generalmente se refiere a la concentración de amonio presente en la disolución de cultivo celular. En otros contextos, un sobrenadante de cultivo celular se refiere a una disolución de cultivo celular de la que se han retirado las células (es decir, un sobrenadante de cultivo celular recuperado).

Tal como se usa en el presente documento, los términos “vitamina B3”, “nicotinamida”, “niacinamida”, “niacina” y “ácido nicotínico” pueden usarse de manera intercambiable para referirse a cualquier miembro de la familia B3 de vitaminas. Por consiguiente, cualquier miembro de esta familia puede usarse para complementar el medio usado en los métodos de la presente divulgación.

Tal como se usa en el presente documento, el término “medio definido químicamente” o “medios definidos químicamente” se refiere a un medio de crecimiento sintético en el que se conocen la identidad y la concentración de todos los componentes. Los medios definidos químicamente no contienen extractos bacterianos, de levadura, animales o vegetales, aunque pueden incluir o no componentes derivados de plantas o animales individuales (por ejemplo, proteínas, polipéptidos, etc.). Los ejemplos no limitativos de medios definidos químicamente disponibles comercialmente incluyen, diversos medios de Eagle modificados por Dulbecco (DME) (Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc), mezcla de nutrientes de Ham (Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc), combinaciones de los mismos, y similares. Se conocen en la técnica métodos de preparación de medios de cultivo definidos químicamente, por ejemplo, en las patentes estadounidenses números 6.171.825 y 6.936.441, el documento WO 2007/077217, y las publicaciones de solicitud de patente estadounidense números 2008/0009040 y 2007/0212770.

Tal como se usa en el presente documento, el término “medio de cultivo libre de oligopéptidos” o “medios de cultivo libres de oligopéptidos” se refiere a un medio libre de proteínas que no comprende oligopéptidos, tales como, por ejemplo, oligopéptidos derivados de un hidrolizado de proteínas. En una realización, el medio no comprende oligopéptidos que tienen veinte o más aminoácidos. En una realización de la presente invención, el medio no comprende oligopéptidos que tienen quince o más aminoácidos. En otra realización de la invención, el medio no comprende oligopéptidos que tienen diez o más aminoácidos. En una realización, el medio no comprende oligopéptidos que tienen siete o más aminoácidos. En otra realización, el medio no comprende oligopéptidos que tienen cinco o más aminoácidos. Todavía en otra realización, el medio no comprende oligopéptidos que tienen tres o más aminoácidos. Según una realización adicional de la presente invención, el medio no comprende oligopéptidos que tienen dos o más aminoácidos. Se conocen en la técnica métodos de preparación de medio de cultivo libre de oligopéptidos, por ejemplo, en las patentes estadounidenses números 6.171.825 y 6.936.441, el documento WO2007/077217, y las publicaciones de solicitud de patente estadounidense números 2008/0009040 y 2007/0212770.

Tal como se usa en el presente documento, el término “medio de cultivo libre de suero” o “medios de cultivo libres de suero” se refiere a un medio de cultivo que no está complementado con un suero animal. Aunque en ocasiones los medios libres de suero son medios definidos químicamente, los medios libres de suero pueden complementarse con proteínas diferenciadas de plantas o animales o fracciones de proteínas. Se conocen en la técnica métodos de preparación de medio de cultivo libre de suero, por ejemplo, en las patentes estadounidenses números 6.171.825 y 6.936.441, el documento WO 2007/077217, y las publicaciones de solicitud de patente estadounidense números 2008/0009040 y 2007/0212770.

Tal como se usa en el presente documento, el término “medio de cultivo libre de proteínas animales” o “medios de cultivo libres de proteínas animales” se refiere a un medio de cultivo que no está complementado con un suero, proteína o fracción de proteína animal. Aunque en ocasiones los medios de cultivo libres de proteínas animales son medios definidos químicamente, los medios de cultivo libres de proteínas animales pueden contener hidrolizados de plantas o levaduras. Se conocen en la técnica métodos de preparación de medio de cultivo libre de proteínas

animales, por ejemplo, en las patentes estadounidenses números 6.171.825 y 6.936.441, el documento WO 2007/077217 y las publicaciones de solicitud de patente estadounidense números 2008/0009040 y 2007/0212770.

Tal como se usa en el presente documento, el término “medio de cultivo celular basal” o “medios de cultivo celular basales” se refiere a un medio de cultivo definido químicamente, un medio de cultivo libre de oligopéptidos, un medio de cultivo libre de suero, o un medio de cultivo libre de proteínas animales que no se ha complementado con un hidrolizado, por ejemplo, un hidrolizado de plantas o levaduras. Se conocen bien en la técnica medios basales, por ejemplo, DMEM, F12 de Ham, DMEM/F12 de Ham, medio 199, McCoy o RPMI. El medio basal puede incluir varios componentes, incluyendo aminoácidos, vitaminas, sales orgánicas e inorgánicas, y fuentes de hidratos de carbono. Cada componente puede estar presente en una cantidad que soporta el cultivo de una célula, conociéndose tales cantidades generalmente por un experto en la técnica. El medio puede incluir sustancias auxiliares, tales como sustancias tampón, por ejemplo, bicarbonato de sodio, antioxidantes, estabilizantes para contrarrestar tensiones mecánicas, o inhibidores de proteasa. Si es necesario, puede añadirse un tensioactivo no iónico tal como copolímeros y/o mezclas de polietilenglicoles o polipropilenglicoles.

III. Medios de cultivo celular y sobrenadante de cultivo celular

Un aspecto de la presente invención se refiere a medios de cultivo celular para producir rvWF que tienen actividad aumentada en comparación con rvWF producidos con medios de cultivo celular basales. En un aspecto, la presente invención se refiere a medios de cultivo celular para producir rvWF en los que los medios de cultivo celular basales se complementan con una o más sustancias adicionales. En realizaciones específicas y tal como se comenta en mayor detalle a continuación, las condiciones de cultivo celular usadas en la presente invención incluyen medios de cultivo celular basales complementados para tener al menos cobre 2,4 µg/l y se controlan de manera que el sobrenadante de cultivo celular mantiene un bajo nivel de amonio, es decir, menos de 4 mM.

Los medios de cultivo usados en la presente invención pueden basarse en un medio basal adecuado bien conocido en la técnica, por ejemplo, DMEM, F12 de Ham, DMEM/F12 de Ham, medio 199, McCoy o RPMI. El medio basal puede incluir varios componentes, incluyendo aminoácidos, vitaminas, sales orgánicas e inorgánicas, y fuentes de hidratos de carbono. Cada componente puede estar presente en una cantidad que soporta el cultivo de una célula, conociéndose generalmente tales cantidades por un experto en la técnica. El medio puede incluir sustancias auxiliares, tales como sustancias tampón, por ejemplo, bicarbonato de sodio, antioxidantes, estabilizantes para contrarrestar tensiones mecánicas, o inhibidores de proteasa. Si es necesario, puede añadirse un tensioactivo no iónico tal como copolímeros y/o mezclas de polietilenglicoles o polipropilenglicoles.

Generalmente, los medios basales contienen menos de 1 µg/l de cobre (por ejemplo, DMEM/F12 de Ham tiene una concentración de cobre de aproximadamente 0,3 µg/l). Tales concentraciones de cobre no proporcionan suficientes iones de cobre como para soportar la producción de las proteínas rvWF en la presente invención, que muestran alta actividad específica.

El cobre puede proporcionarse a los medios de cultivo celular usados en la presente invención a través de una variedad de formas, tales como a través de la adición de un complemento de medio. En algunas realizaciones, el complemento de medio puede contener hidrolizado, que puede proporcionarse para aumentar la concentración de cobre en los medios. Los hidrolizados pueden incluir cualquier hidrolizado bien conocido en la técnica, tales como hidrolizados de plantas, hidrolizados de soja e hidrolizado de gluten de trigo. En determinadas realizaciones, la adición de hidrolizado puede contribuir a una concentración de cobre aumentada de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 10 µg/l de Cu²⁺. En algunas realizaciones, la cantidad de cobre proporcionada por el hidrolizado puede depender de la cantidad de cobre en el hidrolizado así como de la cantidad de hidrolizado añadida. El contenido en cobre de un hidrolizado puede determinarse mediante análisis elemental, por ejemplo, espectroscopía de adsorción atómica (GFAA: adsorción atómica con horno de grafito), o métodos de espectroscopía de masas (por ejemplo, ICP-EM).

En determinadas realizaciones, el cobre puede proporcionarse a los medios de cultivo solo o además del hidrolizado proporcionando un complemento de medio que incluye una sal de cobre o quelato de cobre adecuado. Las sales de cobre adecuadas pueden incluir, pero no se limitan a, sulfato de cobre, acetato de cobre, carbonato de cobre, cloruro de cobre, hidróxido de cobre, nitrato de cobre y óxido de cobre. Los quelantes de cobre adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, albúmina, ácido etilendiaminetetraacético (EDTA), agentes quelantes de poliamina, etilendiamina, dietilentriamina, trietilentetramina, trietildiamina, tetraetilenpentamina, aminoetilanolamina, aminoetilpiperazina, pentaetilenhexamina, clorhidrato de trietilentetramina, clorhidrato de tetraetilenpentamina, clorhidrato de pentaetilenhexamina, tetraetilenpentamina, captopril, penicilamina, N,N'-bis(3-aminopropil)-1,3-propanodiamina, N,N-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina, 1,7-dioxa-4,10-diazaciclododecano, 1,4,8,11-tetraaza-ciclotetradecano-5,7-diona, triclóhidrato de 1,4,7-triazaciclononano, 1-oxa-4,7,10-triazaciclododecano, 1,4,8,12-tetraaza-ciclopentadecano, y 1,4,7,10-tetraaza-ciclododecano.

En determinadas realizaciones, los medios de cultivo celular basales se complementan con cobre para dar como

resultado una concentración total de cobre de aproximadamente 2,4 µg/l a aproximadamente 20 µg/l. En una realización específica, los medios celulares basales se complementan con cobre hasta una concentración final de entre aproximadamente 2,4 y aproximadamente 10 µg/l. En realizaciones adicionales, los medios de cultivo celular basales usados en métodos de la presente divulgación se complementan para dar como resultado aproximadamente cobre 2,6-6,0, 2,8-5,5, 3,0-5,0, 3,2-4,5, 3,4-4 y 2-4 µg/l. Aún en otras realizaciones, los medios de cultivo celular basales usados en métodos de la presente divulgación se complementan para dar como resultado aproximadamente cobre 1-6, 2-5, 3-4 µg/l. En una realización, los medios de cultivo celular basales se complementan con cobre para dar como resultado una concentración de total de cobre de al menos 2,4 µg/l. Aún en otra realización, los medios de cultivo celular basales se complementan con cobre para dar como resultado una concentración total de cobre de al menos 4 µg/l. En determinadas realizaciones, los medios de cultivo celular basales se complementan con cobre para dar como resultado una concentración total de cobre de al menos cobre 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 µg/l, o más. En determinadas realizaciones y tal como se comenta con detalle adicional en el presente documento, los cultivos para producir rA13 pueden contener desde aproximadamente 2-4 µg/l de cobre, mientras que los cultivos para producir rVWF pueden contener al menos 2,4 µg/l de cobre.

Las concentraciones indicadas anteriormente son las concentraciones respectivas de cobre puro, en forma cúprica (Cu^{2+}). Si se usa un derivado de cobre, por ejemplo, una sal hidratada, o un compuesto que comprende cobre, por ejemplo, un quelante de cobre, la cantidad de derivado o quelante se añade de manera que la concentración final del cobre está en los intervalos descritos en el presente documento. Por ejemplo, 2 µg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ es equivalente a una concentración de cobre de aproximadamente 0,51 µg/l (sin sulfato y $5\text{H}_2\text{O}$).

Ventajosamente, se ha encontrado que el uso del medio de cultivo celular en procedimientos de cultivo celular que dan como resultado bajas concentraciones de amonio (NH_4^+) en la disolución de cultivo celular (es decir, en el sobrenadante de cultivo) da como resultado la expresión de vWF recombinante y/o rA13 con actividades específicas mayores. Por consiguiente, la concentración de NH_4^+ del sobrenadante no es mayor de 10 mM. En una realización preferida, la concentración de NH_4^+ del sobrenadante no es mayor de 4 mM. En aún en otras realizaciones, la concentración de NH_4^+ del sobrenadante no es mayor de 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos.

Por consiguiente, en determinadas realizaciones, los métodos y las composiciones proporcionados en el presente documento se basan en el uso de medios de cultivo celular basales complementados con cobre (hasta una concentración final de al menos 2,4 µg/l usados en un procedimiento que da como resultado una concentración de NH_4^+ no mayor de 4 mM en el sobrenadante. Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo celular basal se complementa para proporcionar una concentración de cobre y de amonio finales según una cualquiera de las variaciones de 1 a 440, tal como se proporciona en la tabla 1, siempre que la concentración de cobre sea de al menos 2,4 µg/l y la concentración de NH_4^+ no sea mayor de 4 mM.

Tabla 1. Realizaciones a modo de ejemplo de concentraciones de cobre y amonio presentes en medios de cultivo y sobrenadantes útiles para la expresión de proteínas recombinantes tal como se proporciona en el presente documento.

Concentración de amonio												
		N.D.	NMT 10mM	NMT 9mM	NMT 8mM	NMT 7mM	NMT 6mM	NMT 5mM	NMT 4mM	NMT 3mM	NMT 2mM	NMT 1mM

Concentración de cobre	AL 1 µg/L	Var. 1	Var. 41	Var. 81	Var. 121	Var. 161	Var. 201	Var. 241	Var. 281	Var. 321	Var. 361	Var. 401
	AL 2 µg/L	Var. 2	Var. 42	Var. 82	Var. 122	Var. 162	Var. 202	Var. 242	Var. 282	Var. 322	Var. 362	Var. 402
	AL 3 µg/L	Var. 3	Var. 43	Var. 83	Var. 123	Var. 163	Var. 203	Var. 243	Var. 283	Var. 323	Var. 363	Var. 403
	AL 4 µg/L	Var. 4	Var. 44	Var. 84	Var. 124	Var. 164	Var. 204	Var. 244	Var. 284	Var. 324	Var. 364	Var. 404
	AL 5 µg/L	Var. 5	Var. 45	Var. 85	Var. 125	Var. 165	Var. 205	Var. 245	Var. 285	Var. 325	Var. 365	Var. 405
	AL 6 µg/L	Var. 6	Var. 46	Var. 86	Var. 126	Var. 166	Var. 206	Var. 246	Var. 286	Var. 326	Var. 366	Var. 406
	AL 7 µg/L	Var. 7	Var. 47	Var. 87	Var. 127	Var. 167	Var. 207	Var. 247	Var. 287	Var. 327	Var. 367	Var. 407
	AL 8 µg/L	Var. 8	Var. 48	Var. 88	Var. 128	Var. 168	Var. 208	Var. 248	Var. 288	Var. 328	Var. 368	Var. 408
	AL 9 µg/L	Var. 9	Var. 49	Var. 89	Var. 129	Var. 169	Var. 209	Var. 249	Var. 289	Var. 329	Var. 369	Var. 409
	AL 10 µg/L	Var. 10	Var. 50	Var. 90	Var. 130	Var. 170	Var. 210	Var. 250	Var. 290	Var. 330	Var. 370	Var. 410
	Aprox. 1 µg/L	Var. 11	Var. 51	Var. 91	Var. 131	Var. 171	Var. 211	Var. 251	Var. 291	Var. 331	Var. 371	Var. 411
	Aprox. 1.5 µg/L	Var. 12	Var. 52	Var. 92	Var. 132	Var. 172	Var. 212	Var. 252	Var. 292	Var. 332	Var. 372	Var. 412
	Aprox. 2 µg/L	Var. 13	Var. 53	Var. 93	Var. 133	Var. 173	Var. 213	Var. 253	Var. 293	Var. 333	Var. 373	Var. 413
	Aprox. 2.5 µg/L	Var. 14	Var. 54	Var. 94	Var. 134	Var. 174	Var. 214	Var. 254	Var. 294	Var. 334	Var. 374	Var. 414
	Aprox. 3 µg/L	Var. 15	Var. 55	Var. 95	Var. 135	Var. 175	Var. 215	Var. 255	Var. 295	Var. 335	Var. 375	Var. 415
	Aprox. 3.5 µg/L	Var. 16	Var. 56	Var. 96	Var. 136	Var. 176	Var. 216	Var. 256	Var. 296	Var. 336	Var. 376	Var. 416
	Aprox. 4 µg/L	Var. 17	Var. 57	Var. 97	Var. 137	Var. 177	Var. 217	Var. 257	Var. 297	Var. 337	Var. 377	Var. 417
	Aprox. 4.5 µg/L	Var. 18	Var. 58	Var. 98	Var. 138	Var. 178	Var. 218	Var. 258	Var. 298	Var. 338	Var. 378	Var. 418
	Aprox. 5 µg/L	Var. 19	Var. 59	Var. 99	Var. 139	Var. 179	Var. 219	Var. 259	Var. 299	Var. 339	Var. 379	Var. 419
	Aprox. 5.5 µg/L	Var. 20	Var. 60	Var. 100	Var. 140	Var. 180	Var. 220	Var. 260	Var. 300	Var. 340	Var. 380	Var. 420
	Aprox. 6 µg/L	Var. 21	Var. 61	Var. 101	Var. 141	Var. 181	Var. 221	Var. 261	Var. 301	Var. 341	Var. 381	Var. 421
	Aprox. 7 µg/L	Var. 22	Var. 62	Var. 102	Var. 142	Var. 182	Var. 222	Var. 262	Var. 302	Var. 342	Var. 382	Var. 422
	Aprox. 8 µg/L	Var. 23	Var. 63	Var. 103	Var. 143	Var. 183	Var. 223	Var. 263	Var. 303	Var. 343	Var. 383	Var. 423
	Aprox. 9 µg/L	Var. 24	Var. 64	Var. 104	Var. 144	Var. 184	Var. 224	Var. 264	Var. 304	Var. 344	Var. 384	Var. 424

Aprox.	10	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	25	65	105	145	185	225	265	305	345	385	425	425
1-20	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	26	66	106	146	186	226	266	306	346	386	426	426
2-20	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	27	67	107	147	187	227	267	307	347	387	427	427
1-10	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	28	68	108	148	188	228	268	308	348	388	428	428
2-10	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	29	69	109	149	189	229	269	309	349	389	429	429
1-6	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	30	70	110	150	190	230	270	310	350	390	430	430
2-6	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	31	71	111	151	191	231	271	311	351	391	431	431
3-6	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	32	72	112	152	192	232	272	312	352	392	432	432
4-6	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	33	73	113	153	193	233	273	313	353	393	433	433
1-5	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	34	74	114	154	194	234	274	314	354	394	434	434
2-5	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	35	75	115	155	195	235	275	315	355	395	435	435
3-5	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	36	76	116	156	196	236	276	316	356	396	436	436
4-5	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	37	77	117	157	197	237	277	317	357	397	437	437
1-4	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	38	78	118	158	198	238	278	318	358	398	438	438
2-4	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	39	79	119	159	199	239	279	319	359	399	439	439
3-4	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	40	80	120	160	200	240	280	320	360	400	440	440

*ND = no definido

*NMT= no más de

*AL = al menos

5

En algunas realizaciones, los medios complementados con cobre usados en la presente invención se producen complementando medios basales que están libres de proteínas animales y/o definidos químicamente. Se conocen en la técnica métodos de preparación de medios de cultivo libres de proteínas animales y definidos químicamente, por ejemplo, en las patentes estadounidenses números 6.171.825 y 6.936.441, documento WO 2007/077217, y las publicaciones de solicitud de patente estadounidense números 2008/0009040 y 2007/0212770. En una realización, el medio de cultivo basal usado en los métodos descritos en el presente documento es un medio libre de proteínas animales o libre de oligopéptidos. En determinadas realizaciones, el medio de cultivo puede estar definido químicamente. En determinadas realizaciones, los medios de cultivo pueden contener al menos una poliamina a una concentración de aproximadamente 0,5 mg/l a aproximadamente 10 mg/l.

15

En realizaciones adicionales y además cualquiera de las descripciones proporcionadas anteriormente, se proporcionan medios de cultivo usados en la invención en que un medio basal se complementa con cobre y al menos uno de calcio, cinc y/o vitamina B3. En determinadas realizaciones, el medio puede ser un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente. En determinadas realizaciones, el medio libre de proteínas animales o libre de oligopéptidos se prepara tal como se enseña en las patentes estadounidenses números 6.171.825 y 6.936.441, el documento WO 2007/077217, y las publicaciones de solicitud de patente estadounidense números 2008/0009040 y 2007/0212770, y se complementa con cobre adicional y opcionalmente con uno o más de calcio, cinc y vitamina B3. En una realización específica, el medio de cultivo definido químicamente puede ser similar a una mezcla de medio de Eagle modificado por Dulbecco / F12 de Ham (DMEM/F12 de Ham) 1:1, que se ha complementado con cobre adicional y opcionalmente calcio, cinc y/o vitamina B3, con el fin de aumentar la actividad específica de rVWF o rA13 expresado en una célula cultivada en el medio. Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo está libre de componentes animales. En otra realización, el medio de cultivo contiene proteínas, por ejemplo, proteínas animales de suero tal como suero bovino fetal. En otra realización, el cultivo tiene proteínas recombinantes añadidas de manera exógena. En otra realización, las proteínas proceden de un animal libre de patógenos certificado.

30

- En determinadas realizaciones, los medios de cultivo contienen al menos una poliamina a una concentración de o aproximadamente entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo contiene al menos una poliamina a o aproximadamente entre 0,5 mg/l y 10 mg/l. En una realización, el medio de cultivo contiene al menos una poliamina a o aproximadamente entre 2 mg/l y 8 mg/l. En determinadas realizaciones la poliamina es del grupo de ornitina, putrescina, espermina o espermidina, o similares. En una realización preferida, la poliamina es putrescina. En una realización específica, el medio de cultivo contiene putrescina a o aproximadamente entre 2 mg/l y 8 mg/l.
- En una realización, los medios de cultivo contienen al menos una poliamina a una concentración de o aproximadamente entre 0,5 mg/l y 30 mg/l y una combinación de cobre y amonio según una cualquiera de las variaciones 1 a 440, tal como se expone en la tabla 1, siempre que la concentración de cobre sea de al menos 2,4 $\mu\text{g/l}$ y la concentración de NH_4^+ no sea mayor de 4 mM. En otra realización, el medio de cultivo contiene al menos una poliamina a o aproximadamente entre 0,5 mg/l y 10 mg/l y una combinación de cobre y amonio según una cualquiera de las variaciones 1 a 440, tal como se expone en la tabla 1, siempre que la concentración de cobre sea de al menos 2,4 $\mu\text{g/l}$ y la concentración de NH_4^+ no sea mayor de 4 mM. En una realización, el medio de cultivo contiene al menos una poliamina a o aproximadamente entre 2 mg/l y 8 mg/l y una combinación de cobre y amonio según una cualquiera de las variaciones 1 a 440, tal como se expone en la tabla 1, siempre que la concentración de cobre sea de al menos 2,4 $\mu\text{g/l}$ y la concentración de NH_4^+ no sea mayor de 4 mM. En determinadas realizaciones la poliamina es del grupo de ornitina, putrescina, espermina o espermidina, o similares. En una realización preferida, la poliamina es putrescina. En una realización específica, el medio de cultivo contiene putrescina a o aproximadamente entre 2 mg/l y 8 mg/l y una combinación de cobre y amonio según una cualquiera de las variaciones 1 a 440, tal como se expone en la tabla 1, siempre que la concentración de cobre sea de al menos 2,4 $\mu\text{g/l}$ y la concentración de NH_4^+ no sea mayor de 4 mM.
- En aspectos adicionales, además de cobre, los medios de cultivo celular que se usan en la presente invención pueden incluir adicionalmente uno o más de: calcio adicional, cinc, una o más vitaminas, y cualquier combinación de los mismos.
- Generalmente, puede usarse cualquier sal de calcio para complementar los medios usados en la invención, incluyendo los ejemplos no limitativos de sales aceptables CaCl_2 , CaCl_2 , $\text{CaFPO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CaI_2 , CaBr_2 , $(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2\text{Ca}$, $(\text{CHO}_2)_2\text{Ca}$, $(\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6)_2\text{Ca}$, $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2\text{Ca}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, y similares. En determinadas realizaciones, se usa una sal de calcio farmacéuticamente aceptable para complementar los medios de cultivo usados en la invención.
- Generalmente, puede usarse cualquier sal de cinc para complementar los medios usados en la invención, incluyendo los ejemplos no limitativos de sales aceptables, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2\text{Zn}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ZnBr_2 , $\text{ZnBr}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, y similares. En determinadas realizaciones, se usa una sal de cinc farmacéuticamente aceptable para complementar los medios de cultivo usados en la invención. En otras realizaciones, puede usarse una preparación de proteína o péptido que contiene cinc, por ejemplo, insulina, para el complemento del cultivo proporcionado en el presente documento.
- Todavía en aspectos adicionales, pueden usarse adicionalmente medios celulares basales complementados con cobre y uno o más de los materiales adicionales comentados anteriormente en cultivos con bajos niveles de amonio en el sobrenadante. En determinadas realizaciones, los medios de cultivo celular complementados para su uso en la presente invención dan como resultado niveles de amonio en la disolución de cultivo celular por debajo de 10 mM. En realizaciones adicionales, los medios de cultivo celular complementados usados en la presente invención se usan con niveles de amonio de cultivo celular de desde aproximadamente 0,5-9,5, 1,0-9,0, 1,5-8,5, 2,0-8,0, 2,5-7,5, 3,0-7,0, 6,5-4,0, 4,5-5,5 mM.
- En una realización, las concentraciones de cobre y amonio de los medios de cultivo celular y un sobrenadante de cultivo celular se mantienen durante un periodo de tiempo prolongado durante el procedimiento de fabricación. En una realización específica, las concentraciones de cobre y amonio de un cultivo celular se mantienen durante la duración de un procedimiento de fabricación, es decir, durante el tiempo en que está expresándose rWVF o rA13 y recuperándose de un cultivo celular a gran escala. En determinadas realizaciones, las concentraciones de cobre y amonio se mantienen en la disolución de cultivo a un nivel según una cualquiera de las variaciones 1 a 440, tal como se expone en la tabla 1, siempre que la concentración de cobre sea de al menos 2,4 $\mu\text{g/l}$ y la concentración de NH_4^+ no sea mayor de 4 mM. En una realización preferida, las concentraciones de cobre y amonio se mantienen durante todo el tiempo de tal procedimiento de producción.
- En algunas realizaciones, el medio de cultivo usado en la invención puede proporcionarse en forma líquida o seca o de polvo. Pueden tomarse previamente alícuotas del medio en una cantidad adecuada para un solo uso o proporcionarse en mayor cantidad de la que puede usarse para más de un cultivo celular. Generalmente, el medio usado en la invención se proporcionará de modo estéril.
- A continuación, se comentan detalles específicos de medios de cultivo celular que se usan para producir rWVF o rA13. Aunque lo siguiente se comenta con respecto a o bien rWVF o bien rA13, se apreciará que cualquiera de la

descripción proporcionada a continuación con respecto a rVWF puede aplicarse a rA13, y viceversa.

A. Medios de cultivo celular de vWF recombinante

5 Un aspecto de la presente invención se refiere a una disolución de cultivo celular para producir vWF recombinante, más específicamente, vWF de alto peso molecular que tiene una alta actividad específica, que se describe adicionalmente en el presente documento. En una realización, la presente invención proporciona una disolución de cultivo celular para producir vWF recombinante, de alto peso molecular, que comprende un medio de cultivo celular que comprende una concentración de cobre de entre 2,4 µg/l y una concentración de amonio de no más de 4 mM.

10 Aún en otras realizaciones de la presente divulgación, el cultivo celular tiene una concentración de cobre y amonio según una cualquiera de las variaciones 1 a 440, tal como se expone en la tabla 1, siempre que la concentración de cobre sea de al menos 2,4 µg/l y la concentración de NH₄⁺ no sea mayor de 4 mM. En determinadas realizaciones, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene durante un periodo prolongado a una concentración tal como se proporcionó anteriormente. Por ejemplo, en una realización, la concentración de amonio se mantiene a una

15 concentración baja durante al menos 3 días, o al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 o más días. En una realización específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 5 mM durante al menos 7 días. En otra realización específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 4 mM durante al menos 7 días. En otra realización específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 4 mM durante al menos 14 días. Aún en otra realización, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a un nivel bajo durante la duración del procedimiento (es decir, durante todo el tiempo en que está usándose el cultivo para producir rVWF).

25 En una realización de la invención, los medios de cultivo celular pueden comprender una concentración de cobre de al menos aproximadamente 2,4 µg/l, en otra realización de al menos aproximadamente 3 µg/l, aún en otra realización de al menos aproximadamente 4 µg/l, aún en otra realización de al menos aproximadamente 8 µg/l, aún en otra realización de al menos aproximadamente 10 µg/l, aún en otra realización de al menos aproximadamente 15 µg/l, y en una realización adicional de al menos 20 µg/l.

30 En otras realizaciones, la concentración de cobre en los medios de cultivo celular usados en la presente invención puede oscilar desde aproximadamente 2,4 µg/l hasta aproximadamente 20 µg/l, en otra realización desde aproximadamente 2,4 µg/l hasta aproximadamente 15 µg/l, aún en otra realización desde aproximadamente 2,4 µg/l hasta aproximadamente 10 µg/l, aún en otra realización desde aproximadamente 2,4 µg/l hasta aproximadamente 8 µg/l, aún en otra realización desde aproximadamente 2,4 µg/l hasta aproximadamente 6 µg/l, aún en otra

35 realización desde aproximadamente 2,4 µg/l hasta aproximadamente 4 µg/l, aún en otra realización desde aproximadamente 4 µg/l hasta aproximadamente 20 µg/l, aún en otra realización desde aproximadamente 4 µg/l hasta aproximadamente 15 µg/l, aún en otra realización desde aproximadamente 4 µg/l hasta aproximadamente 10 µg/l, aún en otra realización desde aproximadamente 4 µg/l hasta aproximadamente 8 µg/l, y en una realización adicional desde aproximadamente 4 µg/l hasta aproximadamente 6 µg/l.

40 La presente divulgación también proporciona kits para la expresión o producción de rVWF, comprendiendo los kits un medio de cultivo adecuado para la expresión de rVWF que tiene alta actividad específica.

B. Medios de cultivo celular de ADAMTS13 (A13)

45 En un aspecto, la presente divulgación proporciona medios de cultivo que son útiles para la expresión de proteínas ADAMTS que tienen altas actividades específicas. Ventajosamente, se ha encontrado que, complementando un medio de cultivo con cobre, se potencian enormemente las actividades de las enzimas ADAMTS recombinantes (por ejemplo, rADAMTS13) expresadas en células cultivadas en el medio complementado, mientras que las enzimas se expresan a niveles tan altos como, si no mayores que, los de células cultivadas en medios no complementados.

50 En un aspecto, la presente divulgación proporciona medios de cultivo celular complementados con cobre para la expresión de la proteína ADAMTS13 recombinante con alta actividad específica. En una realización, los medios se complementan para dar como resultado una concentración total de cobre de desde aproximadamente 2 hasta

55 aproximadamente 4 µg/l. En realizaciones adicionales, los medios se complementan para dar como resultado una concentración total de cobre de desde aproximadamente 1-3, 2-3, 3-4 µg/l. En una realización, los medios contienen una concentración de cobre de al menos 1 µg/l. En otra realización, los medios contienen al menos cobre 2 µg/l. En otra realización, los medios contienen al menos cobre 4 µg/l. En otras realizaciones, los medios contienen cobre entre 2 µg/l y 20 µg/l. En otra realización, los medios contienen cobre entre 1 µg/l y 6 µg/l. En otra realización, los

60 medios contienen cobre entre 2 µg/l y 5 µg/l. En otra realización, los medios contienen cobre entre 3 µg/l y 4 µg/l. Aún en otras realizaciones, los medios contienen al menos cobre 1 µg/l, o al menos cobre 2 µg/l, 3 µg/l, 4 µg/l, 5 µg/l, 6 µg/l, 7 µg/l, 8 µg/l, 9 µg/l, 10 µg/l, 11 µg/l, 12 µg/l, 13 µg/l, 14 µg/l, 15 µg/l, 16 µg/l, 17 µg/l, 18 µg/l, 19 µg/l, 20 µg/l, o concentraciones mayores de cobre.

En una realización, la disolución de cultivo celular comprende además una concentración de amonio de menos de 10 mM. En una realización preferida, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 5 mM. Aún en otras realizaciones, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 10 mM, o no más de 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos. Aún en otras realizaciones, la disolución de cultivo celular tiene una concentración de cobre y amonio según una cualquiera de las variaciones 1 a 440, tal como se expone en la tabla 1. En determinadas realizaciones, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene durante un periodo prolongado a una concentración tal como se proporcionó anteriormente. Por ejemplo, en una realización, la concentración de amonio se mantiene a concentración baja durante al menos 3 días, o al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 o más días. En una realización específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 5 mM durante al menos 7 días. En otra realización específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 4 mM durante al menos 7 días. En una realización específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 5 mM durante al menos 14 días. En otra realización específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 4 mM durante al menos 14 días. Aún en otra realización, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a un nivel bajo durante la duración del procedimiento (es decir, durante todo el tiempo en que está usándose el cultivo para producir rA13).

En una realización, se proporciona un medio de cultivo para la expresión de una proteína ADAMTS recombinante (por ejemplo, rADAMTS13) que contiene al menos cobre $1 \mu\text{g/l}$ y al menos cinc $2 \mu\text{M}$. En otras realizaciones, los medios contienen al menos cobre $2 \mu\text{g/l}$ o al menos cobre $4 \mu\text{g/l}$. En otra realización en la que los medios se complementan con cobre, el medio de cultivo también contiene cinc al menos a o aproximadamente $5 \mu\text{M}$. En una realización, el medio de cultivo también contiene cinc a o aproximadamente entre $2 \mu\text{M}$ y $12 \mu\text{M}$. En otra realización, el medio de cultivo también contiene cinc a o aproximadamente entre $5 \mu\text{M}$ y $12 \mu\text{M}$. Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo también puede contener cinc al menos a o aproximadamente $2 \mu\text{M}$, o al menos a o aproximadamente $3 \mu\text{M}$, $4 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$, $6 \mu\text{M}$, $7 \mu\text{M}$, $8 \mu\text{M}$, $9 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $11 \mu\text{M}$, $12 \mu\text{M}$, $13 \mu\text{M}$, $14 \mu\text{M}$, $15 \mu\text{M}$, $20 \mu\text{M}$, $25 \mu\text{M}$, $30 \mu\text{M}$ o más. En una realización, el medio de cultivo contiene una concentración de cobre y cinc según una cualquiera de las variaciones 441 a 880, tal como se expone en la tabla 2.

Tabla 2. Realizaciones a modo de ejemplo de concentraciones de cobre y cinc presentes en medios de cultivo útiles para la expresión de una proteína ADAMTS13 recombinante.

		Concentración de cinc										
		AL 2 μM	AL 3 μM	AL 4 μM	AL 5 μM	AL 6 μM	AL 7 μM	AL 8 μM	AL 9 μM	AL 10 μM	2-12 μM	5-12 μM
o	AL 1 $\mu\text{g/L}$	Var. 441	Var. 481	Var. 521	Var. 561	Var. 601	Var. 641	Var. 681	Var. 721	Var. 761	Var. 801	Var. 841

ES 2 761 692 T3

AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
2 µg/L	442	482	522	562	602	642	682	722	762	802	842	
AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
3 µg/L	443	483	523	563	603	643	683	723	763	803	843	
AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
4 µg/L	444	484	524	564	604	644	684	724	764	804	844	
AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
5 µg/L	445	485	525	565	605	645	685	725	765	805	845	
AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
6 µg/L	446	486	526	566	606	646	686	726	766	806	846	
AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
7 µg/L	447	487	527	567	607	647	687	727	767	807	847	
AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
8 µg/L	448	488	528	568	608	648	688	728	768	808	848	
AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
9 µg/L	449	489	529	569	609	649	689	729	769	809	849	
AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
10 µg/L	450	490	530	570	610	650	690	730	770	810	850	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
1 µg/L	451	491	531	571	611	651	691	731	771	811	851	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
1.5 µg/L	452	492	532	572	612	652	692	732	772	812	852	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
2 µg/L	453	493	533	573	613	653	693	733	773	813	853	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
2.5 µg/L	454	494	534	574	614	654	694	734	774	814	854	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
3 µg/L	455	495	535	575	615	655	695	735	775	815	855	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
3.5 µg/L	456	496	536	576	616	656	696	736	776	816	856	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
4 µg/L	457	497	537	577	617	657	697	737	777	817	857	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
4.5 µg/L	458	498	538	578	618	658	698	738	778	818	858	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
5 µg/L	459	499	539	579	619	659	699	739	779	819	859	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
5.5 µg/L	460	500	540	580	620	660	700	740	780	820	860	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
6 µg/L	461	501	541	581	621	661	701	741	781	821	861	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
7 µg/L	462	502	542	582	622	662	702	742	782	822	862	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
8 µg/L	463	503	543	583	623	663	703	743	783	823	863	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
9 µg/L	464	504	544	584	624	664	704	744	784	824	864	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
10 µg/L	465	505	545	585	625	665	705	745	785	825	865	

1-20	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	466	506	546	586	626	666	706	746	786	826	866	
2-20	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	467	507	547	587	627	667	707	747	787	827	867	
1-10	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	468	508	548	588	628	668	708	748	788	828	868	
2-10	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	469	509	549	589	629	669	709	749	789	829	869	
1-6	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	470	510	550	590	630	670	710	750	790	830	870	
2-6	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	471	511	551	591	631	671	711	751	791	831	871	
3-6	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	472	512	552	592	632	672	712	752	792	832	872	
4-6	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	473	513	553	593	633	673	713	753	793	833	873	
1-5	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	474	514	554	594	634	674	714	754	794	834	874	
2-5	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	475	515	555	595	635	675	715	755	795	835	875	
3-5	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	476	516	556	596	636	676	716	756	796	836	876	
4-5	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	477	517	557	597	637	677	717	757	797	837	877	
1-4	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	478	518	558	598	638	678	718	758	798	838	878	
2-4	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	479	519	559	599	639	679	719	759	799	839	879	
3-4	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
µg/L	480	520	560	600	640	680	720	760	800	840	880	

*AL = al menos

- 5 En una realización, la disolución de cultivo celular comprende además una concentración de amonio baja. En una realización, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de menos de 10 mM y una concentración de cobre y cinc según una cualquiera de las variaciones 441 a 880, tal como se expone en la tabla 2. En una realización específica, el amonio se mantiene a una concentración de no más de 10 mM durante al menos 7 días.
- 10 En una realización preferida, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 6 mM y una concentración de cobre y cinc según una cualquiera de las variaciones 441 a 880, tal como se expone en la tabla 2. En una realización específica, el amonio se mantiene a una concentración de no más de 6 mM durante al menos 7 días. En otra realización preferida, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 5 mM y una concentración de cobre y cinc según una cualquiera de las variaciones 441 a 880, tal como se expone en la tabla 2. En una realización específica, el amonio se mantiene a una concentración de no más de 5 mM durante al menos 7 días. En otra realización preferida, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 4 mM y una concentración de cobre y cinc según una cualquiera de las variaciones 441 a 880, tal como se expone en la tabla 2. En una realización específica, el amonio se mantiene a una concentración de no más de 4 mM durante al menos 7 días. Aún en otras realizaciones, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 10 mM, o no más de 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos y una concentración de cobre y cinc según una cualquiera de las variaciones 441 a 880, tal como se expone en la tabla 2. Aún en otra realización específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a un nivel bajo durante la duración del procedimiento (es decir, durante todo el tiempo en que está usándose el cultivo para producir rA13).
- 25 En una realización, se proporciona un medio de cultivo para la expresión de una proteína ADAMTS recombinante (por ejemplo, rADAMTS13) que contiene al menos cobre 1 µg/l y al menos calcio a o aproximadamente 0,5 mM. En otras realizaciones, los medios contienen al menos cobre 2 µg/l o al menos cobre 4 µg/l. En otra realización en la que los medios se complementan con cobre, el medio de cultivo también contiene al menos calcio 1,5 mM. En una realización, el medio de cultivo contiene calcio a o aproximadamente entre 0,5 mM y 1,5 mM. Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo puede contener calcio al menos a o aproximadamente 0,5 mM, o al menos a o aproximadamente 0,6 mM, 0,7 mM, 0,8 mM, 0,9 mM, 1,0 mM, 1,1 mM, 1,2 mM, 1,3 mM, 1,4 mM, 1,5 mM, 1,6 mM, 1,7 mM, 1,8 mM, 1,9 mM, 2,0 mM, 2,25 mM, 2,5 mM, 2,75 mM, 3,0 mM, 3,5 mM, 4,0 mM, 4,5 mM, 5,0 mM, o más. En una realización, el medio de cultivo contiene una concentración de cobre y calcio según una cualquiera de las
- 30

variaciones 881 a 1320, tal como se expone en la tabla 3.

Tabla 3. Realizaciones a modo de ejemplo de concentraciones de cobre y calcio presentes en medios de cultivo útiles para la expresión de una proteína ADAMTS13 recombinante.

5

		Concentración de calcio										
		AL 0.5 mM	AL 0.75 mM	AL 1.0 mM	AL 1.25 mM	AL 1.5 mM	AL 2.0 mM	AL 2.5 mM	AL 3.0 mM	AL 4 mM	AL 5 mM	0.5- 1.5 mM
Concentración de cobre	AL 1 µg/L	Var. 881	Var. 921	Var. 961	Var. 1001	Var. 1041	Var. 1081	Var. 1121	Var. 1161	Var. 1201	Var. 1241	Var. 1281
	AL 2 µg/L	Var. 882	Var. 922	Var. 962	Var. 1002	Var. 1042	Var. 1082	Var. 1122	Var. 1162	Var. 1202	Var. 1242	Var. 1282
	AL 3 µg/L	Var. 883	Var. 923	Var. 963	Var. 1003	Var. 1043	Var. 1083	Var. 1123	Var. 1163	Var. 1203	Var. 1243	Var. 1283
	AL 4 µg/L	Var. 884	Var. 924	Var. 964	Var. 1004	Var. 1044	Var. 1084	Var. 1124	Var. 1164	Var. 1204	Var. 1244	Var. 1284
	AL 5 µg/L	Var. 885	Var. 925	Var. 965	Var. 1005	Var. 1045	Var. 1085	Var. 1125	Var. 1165	Var. 1205	Var. 1245	Var. 1285

ES 2 761 692 T3

AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
6 µg/L	886	926	966	1006	1046	1086	1126	1166	1206	1246	1286	
AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
7 µg/L	887	927	967	1007	1047	1087	1127	1167	1207	1247	1287	
AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
8 µg/L	888	928	968	1008	1048	1088	1128	1168	1208	1248	1288	
AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
9 µg/L	889	929	969	1009	1049	1089	1129	1169	1209	1249	1289	
AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
10 µg/L	890	930	970	1010	1050	1090	1130	1170	1210	1250	1290	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
1 µg/L	891	931	971	1011	1051	1091	1131	1171	1211	1251	1291	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
1.5 µg/L	892	932	972	1012	1052	1092	1132	1172	1212	1252	1292	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
2 µg/L	893	933	973	1013	1053	1093	1133	1173	1213	1253	1293	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
2.5 µg/L	894	934	974	1014	1054	1094	1134	1174	1214	1254	1294	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
3 µg/L	895	935	975	1015	1055	1095	1135	1175	1215	1255	1295	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
3.5 µg/L	896	936	976	1016	1056	1096	1136	1176	1216	1256	1296	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
4 µg/L	897	937	977	1017	1057	1097	1137	1177	1217	1257	1297	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
4.5 µg/L	898	938	978	1018	1058	1098	1138	1178	1218	1258	1298	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
5 µg/L	899	939	979	1019	1059	1099	1139	1179	1219	1259	1299	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
5.5 µg/L	900	940	980	1020	1060	1100	1140	1180	1220	1260	1300	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
6 µg/L	901	941	981	1021	1061	1101	1141	1181	1221	1261	1301	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
7 µg/L	902	942	982	1022	1062	1102	1142	1182	1222	1262	1302	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
8 µg/L	903	943	983	1023	1063	1103	1143	1183	1223	1263	1303	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
9 µg/L	904	944	984	1024	1064	1104	1144	1184	1224	1264	1304	
Aprox.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
10 µg/L	905	945	985	1025	1065	1105	1145	1185	1225	1265	1305	
1-20 µg/L	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
906	946	986	1026	1066	1106	1146	1186	1226	1266	1306		
2-20 µg/L	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
907	947	987	1027	1067	1107	1147	1187	1227	1267	1307		
1-10 µg/L	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
908	948	988	1028	1068	1108	1148	1188	1228	1268	1308		
2-10 µg/L	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
909	949	989	1029	1069	1109	1149	1189	1229	1269	1309		

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

*AL = al menos

- 5 En una realización, la disolución de cultivo celular comprende además una concentración de amonio baja. En una realización, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de menos de 10 mM y una concentración de cobre y calcio según una cualquiera de las variaciones 881 a 1320, tal como se expone en la tabla 3. En una realización específica, el amonio se mantiene a una concentración de no más de 10 mM durante al menos 7 días. En una realización preferida, el medio de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 6 mM y una concentración de cobre y calcio según una cualquiera de las variaciones 881 a 1320, tal como se expone en la tabla 3. En una realización específica, el amonio se mantiene a una concentración de no más de 6 mM durante al menos 7 días. En otra realización preferida, el medio de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 5 mM y una concentración de cobre y calcio según una cualquiera de las variaciones 881 a 1320, tal como se expone en la tabla 3. En una realización específica, el amonio se mantiene a una concentración de no más de 5 mM durante al menos 7 días. En otra realización preferida, el medio de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 4 mM y una concentración de cobre y calcio según una cualquiera de las variaciones 881 a 1320, tal como se expone en la tabla 3. En una realización específica, el amonio se mantiene a una concentración de no más de 4 mM durante al menos 7 días. Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 10 mM, o no más de 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos y una concentración de cobre y calcio según una cualquiera de las variaciones 881 a 1320, tal como se expone en la tabla 3. Aún en otra realización específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a un nivel bajo durante la duración del procedimiento (es decir, durante todo el tiempo en que está usándose el cultivo para producir rA13).
- 25 En una realización, el medio de cultivo celular se complementa con cobre, cinc y calcio. En una realización específica, el medio de cultivo tiene una concentración de calcio de al menos 0,5 mM y una concentración de cobre y cinc según una cualquiera de las variaciones 441 a 880, tal como se expone en la tabla 2. En otra realización específica, el medio de cultivo tiene una concentración de calcio de al menos 1,5 mM y una concentración de cobre y cinc según una cualquiera de las variaciones 441 a 880, tal como se expone en la tabla 2. En otra realización específica, el medio de cultivo tiene una concentración de calcio de entre 0,5 mM y 1,5 mM y una concentración de cobre y cinc según una cualquiera de las variaciones 441 a 880, tal como se expone en la tabla 2. Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo tiene una concentración de calcio de al menos 0,6 mM, 0,7 mM, 0,8 mM, 0,9 mM, 1,0 mM, 1,1 mM, 1,2 mM, 1,3 mM, 1,4 mM, 1,5 mM, 1,6 mM, 1,7 mM, 1,8 mM, 1,9 mM, 2,0 mM, 2,25 mM, 2,5 mM, 2,75 mM, 3,0 mM, 3,5 mM, 4,0 mM, 4,5 mM, 5,0 mM, o más, y una concentración de cobre y cinc según una cualquiera de las variaciones 441 a 880, tal como se expone en la tabla 2.
- 35 En una realización, se proporciona un medio de cultivo para la expresión de una proteína ADAMTS recombinante (por ejemplo, rADAMTS13) que contiene al menos cobre 1 µg/l y al menos nicotinamida 2 mg/l (vitamina B3). En otras realizaciones, los medios contienen al menos cobre 2 µg/l o al menos cobre 4 µg/l. En otra realización en la que los medios se complementan con cobre, el medio de cultivo también contiene al menos nicotinamida 7 mg/l (vitamina B3). En una realización, el medio de cultivo contiene nicotinamida (vitamina B3) a o aproximadamente entre 2 mg/l y 10 mg/l. Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo puede contener nicotinamida al menos a o aproximadamente 2 mg/l, 3 mg/l, 4 mg/l, 5 mg/l, 6 mg/l, 7 mg/l, 8 mg/l, 9 mg/l, 10 mg/l, 15 mg/l, 20 mg/l, o

concentraciones mayores de nicotinamida (vitamina B3). En una realización, el medio de cultivo contiene una concentración de cobre y nicotinamida según una cualquiera de las variaciones 1321 a 1760, tal como se expone en la tabla 4.

- 5 Tabla 4. Realizaciones a modo de ejemplo de concentraciones de cobre y nicotinamida presentes en medios de cultivo útiles para la expresión de una proteína ADAMTS13 recombinante.

		Concentraciones de calcio										
		AL 2 mg/mL	AL 3 mg/mL	AL 4 mg/mL	AL 5 mg/mL	AL 6 mg/mL	AL 7 mg/mL	AL 8 mg/mL	AL 9 mg/mL	AL 10 mg/mL	AL 15 mg/mL	2-10 mg/mL
Concentración de cobre	AL 1 µg/L	Var. 1321	Var. 1361	Var. 1401	Var. 1441	Var. 1481	Var. 1521	Var. 1561	Var. 1601	Var. 1641	Var. 1681	Var. 1721
	AL 2 µg/L	Var. 1322	Var. 1362	Var. 1402	Var. 1442	Var. 1482	Var. 1522	Var. 1562	Var. 1602	Var. 1642	Var. 1682	Var. 1722
	AL 3 µg/L	Var. 1323	Var. 1363	Var. 1403	Var. 1443	Var. 1483	Var. 1523	Var. 1563	Var. 1603	Var. 1643	Var. 1683	Var. 1723
	AL 4 µg/L	Var. 1324	Var. 1364	Var. 1404	Var. 1444	Var. 1484	Var. 1524	Var. 1564	Var. 1604	Var. 1644	Var. 1684	Var. 1724
	AL 5 µg/L	Var. 1325	Var. 1365	Var. 1405	Var. 1445	Var. 1485	Var. 1525	Var. 1565	Var. 1605	Var. 1645	Var. 1685	Var. 1725
	AL 6 µg/L	Var. 1326	Var. 1366	Var. 1406	Var. 1446	Var. 1486	Var. 1526	Var. 1566	Var. 1606	Var. 1646	Var. 1686	Var. 1726
	AL 7 µg/L	Var. 1327	Var. 1367	Var. 1407	Var. 1447	Var. 1487	Var. 1527	Var. 1567	Var. 1607	Var. 1647	Var. 1687	Var. 1727
	AL 8 µg/L	Var. 1328	Var. 1368	Var. 1408	Var. 1448	Var. 1488	Var. 1528	Var. 1568	Var. 1608	Var. 1648	Var. 1688	Var. 1728
	AL 9 µg/L	Var. 1329	Var. 1369	Var. 1409	Var. 1449	Var. 1489	Var. 1529	Var. 1569	Var. 1609	Var. 1649	Var. 1689	Var. 1729
	AL 10 µg/L	Var. 1330	Var. 1370	Var. 1410	Var. 1450	Var. 1490	Var. 1530	Var. 1570	Var. 1610	Var. 1650	Var. 1690	Var. 1730
	Aprox. 1 µg/L	Var. 1331	Var. 1371	Var. 1411	Var. 1451	Var. 1491	Var. 1531	Var. 1571	Var. 1611	Var. 1651	Var. 1691	Var. 1731
	Aprox. 1.5 µg/L	Var. 1332	Var. 1372	Var. 1412	Var. 1452	Var. 1492	Var. 1532	Var. 1572	Var. 1612	Var. 1652	Var. 1692	Var. 1732
	Aprox. 2 µg/L	Var. 1333	Var. 1373	Var. 1413	Var. 1453	Var. 1493	Var. 1533	Var. 1573	Var. 1613	Var. 1653	Var. 1693	Var. 1733
	Aprox. 2.5 µg/L	Var. 1334	Var. 1374	Var. 1414	Var. 1454	Var. 1494	Var. 1534	Var. 1574	Var. 1614	Var. 1654	Var. 1694	Var. 1734
	Aprox. 3 µg/L	Var. 1335	Var. 1375	Var. 1415	Var. 1455	Var. 1495	Var. 1535	Var. 1575	Var. 1615	Var. 1655	Var. 1695	Var. 1735
	Aprox. 3.5 µg/L	Var. 1336	Var. 1376	Var. 1416	Var. 1456	Var. 1496	Var. 1536	Var. 1576	Var. 1616	Var. 1656	Var. 1696	Var. 1736
	Aprox. 4 µg/L	Var. 1337	Var. 1377	Var. 1417	Var. 1457	Var. 1497	Var. 1537	Var. 1577	Var. 1617	Var. 1657	Var. 1697	Var. 1737
	Aprox. 4.5 µg/L	Var. 1338	Var. 1378	Var. 1418	Var. 1458	Var. 1498	Var. 1538	Var. 1578	Var. 1618	Var. 1658	Var. 1698	Var. 1738

Aprox. 5 µg/L	Var. 1339	Var. 1379	Var. 1419	Var. 1459	Var. 1499	Var. 1539	Var. 1579	Var. 1619	Var. 1659	Var. 1699	Var. 1739
Aprox. 5.5 µg/L	Var. 1340	Var. 1380	Var. 1420	Var. 1460	Var. 1500	Var. 1540	Var. 1580	Var. 1620	Var. 1660	Var. 1700	Var. 1740
Aprox. 6 µg/L	Var. 1341	Var. 1381	Var. 1421	Var. 1461	Var. 1501	Var. 1541	Var. 1581	Var. 1621	Var. 1661	Var. 1701	Var. 1741
Aprox. 7 µg/L	Var. 1342	Var. 1382	Var. 1422	Var. 1462	Var. 1502	Var. 1542	Var. 1582	Var. 1622	Var. 1662	Var. 1702	Var. 1742
Aprox. 8 µg/L	Var. 1343	Var. 1383	Var. 1423	Var. 1463	Var. 1503	Var. 1543	Var. 1583	Var. 1623	Var. 1663	Var. 1703	Var. 1743
Aprox. 9 µg/L	Var. 1344	Var. 1384	Var. 1424	Var. 1464	Var. 1504	Var. 1544	Var. 1584	Var. 1624	Var. 1664	Var. 1704	Var. 1744
Aprox. 10 µg/L	Var. 1345	Var. 1385	Var. 1425	Var. 1465	Var. 1505	Var. 1545	Var. 1585	Var. 1625	Var. 1665	Var. 1705	Var. 1745
1-20 µg/L	Var. 1346	Var. 1386	Var. 1426	Var. 1466	Var. 1506	Var. 1546	Var. 1586	Var. 1626	Var. 1666	Var. 1706	Var. 1746
2-20 µg/L	Var. 1347	Var. 1387	Var. 1427	Var. 1467	Var. 1507	Var. 1547	Var. 1587	Var. 1627	Var. 1667	Var. 1707	Var. 1747
1-10 µg/L	Var. 1348	Var. 1388	Var. 1428	Var. 1468	Var. 1508	Var. 1548	Var. 1588	Var. 1628	Var. 1668	Var. 1708	Var. 1748
2-10 µg/L	Var. 1349	Var. 1389	Var. 1429	Var. 1469	Var. 1509	Var. 1549	Var. 1589	Var. 1629	Var. 1669	Var. 1709	Var. 1749
1-6 µg/L	Var. 1350	Var. 1390	Var. 1430	Var. 1470	Var. 1510	Var. 1550	Var. 1590	Var. 1630	Var. 1670	Var. 1710	Var. 1750
2-6 µg/L	Var. 1351	Var. 1391	Var. 1431	Var. 1471	Var. 1511	Var. 1551	Var. 1591	Var. 1631	Var. 1671	Var. 1711	Var. 1751
3-6 µg/L	Var. 1352	Var. 1392	Var. 1432	Var. 1472	Var. 1512	Var. 1552	Var. 1592	Var. 1632	Var. 1672	Var. 1712	Var. 1752
4-6 µg/L	Var. 1353	Var. 1393	Var. 1433	Var. 1473	Var. 1513	Var. 1553	Var. 1593	Var. 1633	Var. 1673	Var. 1713	Var. 1753
1-5 µg/L	Var. 1354	Var. 1394	Var. 1434	Var. 1474	Var. 1514	Var. 1554	Var. 1594	Var. 1634	Var. 1674	Var. 1714	Var. 1754
2-5 µg/L	Var. 1355	Var. 1395	Var. 1435	Var. 1475	Var. 1515	Var. 1555	Var. 1595	Var. 1635	Var. 1675	Var. 1715	Var. 1755
3-5 µg/L	Var. 1356	Var. 1396	Var. 1436	Var. 1476	Var. 1516	Var. 1556	Var. 1596	Var. 1636	Var. 1676	Var. 1716	Var. 1756
4-5 µg/L	Var. 1357	Var. 1397	Var. 1437	Var. 1477	Var. 1517	Var. 1557	Var. 1597	Var. 1637	Var. 1677	Var. 1717	Var. 1757
1-4 µg/L	Var. 1358	Var. 1398	Var. 1438	Var. 1478	Var. 1518	Var. 1558	Var. 1598	Var. 1638	Var. 1678	Var. 1718	Var. 1758
2-4 µg/L	Var. 1359	Var. 1399	Var. 1439	Var. 1479	Var. 1519	Var. 1559	Var. 1599	Var. 1639	Var. 1679	Var. 1719	Var. 1759
3-4 µg/L	Var. 1360	Var. 1400	Var. 1440	Var. 1480	Var. 1520	Var. 1560	Var. 1600	Var. 1640	Var. 1680	Var. 1720	Var. 1760

*AL = al menos

- 5 En una realización, la disolución de cultivo celular comprende además una concentración de amonio baja. En una realización, el medio de cultivo comprende una concentración de amonio de menos de 10 mM y una concentración de cobre y nicotinamida según una cualquiera de las variaciones 1321 a 1760, tal como se expone en la tabla 4. En una realización específica, el amonio se mantiene a una concentración de no más de 10 mM durante al menos 7 días. En una realización preferida, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 6 mM y una concentración de cobre y nicotinamida según una cualquiera de las variaciones 1321 a 1760, tal como se expone en la tabla 4.
- 10 En una realización específica, el amonio se mantiene a una concentración de no más de 6 mM durante al menos 7 días. En otra realización preferida, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 5 mM y una concentración de cobre y nicotinamida según una cualquiera de las variaciones 1321 a 1760, tal como se expone en la tabla 4. En una realización específica, el amonio se mantiene

a una concentración de no más de 5 mM durante al menos 7 días. En otra realización preferida, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 4 mM y una concentración de cobre y nicotinamida según una cualquiera de las variaciones 1321 a 1760, tal como se expone en la tabla 4. En una realización específica, el amonio se mantiene a una concentración de no más de 4 mM durante al menos 7 días. Aún en otras realizaciones, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 10 mM, o no más de 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos y una concentración de cobre y nicotinamida según una cualquiera de las variaciones 1321 a 1760, tal como se expone en la tabla 4. Aún en otra realización específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a un nivel bajo durante la duración del procedimiento (es decir, durante todo el tiempo en que está usándose el cultivo para producir rA13).

En una realización, el medio de cultivo celular se complementa con cobre, cinc y nicotinamida. En una realización específica, el medio de cultivo tiene una concentración de nicotinamida de al menos 2 mg/ml y una concentración de cobre y cinc según una cualquiera de las variaciones 441 a 880, tal como se expone en la tabla 2. En otra realización específica, el medio de cultivo tiene una concentración de nicotinamida de al menos 7 mg/ml mM y una concentración de cobre y cinc según una cualquiera de las variaciones 441 a 880, tal como se expone en la tabla 2. En otra realización específica, el medio de cultivo tiene una concentración de nicotinamida de entre 2 mg/ml y 10 mg/ml y una concentración de cobre y cinc según una cualquiera de las variaciones 441 a 880, tal como se expone en la tabla 2. Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo tiene una concentración de nicotinamida de al menos 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13 mg/ml, 14 mg/ml, 15 mg/ml, o más, y una concentración de cobre y cinc según una cualquiera de las variaciones 441 a 880, tal como se expone en la tabla 2.

En una realización, el medio de cultivo celular se complementa con cobre, calcio y nicotinamida. En una realización específica, el medio de cultivo tiene una concentración de nicotinamida de al menos 2 mg/ml y una concentración de cobre y calcio según una cualquiera de las variaciones 881 a 1320, tal como se expone en la tabla 3. En otra realización específica, el medio de cultivo tiene una concentración de nicotinamida de al menos 7 mg/ml mM y una concentración de cobre y calcio según una cualquiera de las variaciones 881 a 1320, tal como se expone en la tabla 3. En otra realización específica, el medio de cultivo tiene una concentración de nicotinamida de entre 2 mg/ml y 10 mg/ml y una concentración de cobre y calcio según una cualquiera de las variaciones 881 a 1320, tal como se expone en la tabla 3. Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo tiene una concentración de nicotinamida de al menos 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13 mg/ml, 14 mg/ml, 15 mg/ml, o más, y una concentración de cobre y calcio según una cualquiera de las variaciones 881 a 1320, tal como se expone en la tabla 3.

IV. Métodos para la producción de factores sanguíneos que tienen alta actividad específica

A. Métodos de cultivo celular

La presente divulgación proporciona métodos para la producción a gran escala de proteínas recombinantes (rvWF). En determinadas realizaciones, los métodos de producción a gran escala utilizan reactores de tanque con agitación/remoción para la fabricación de estas proteínas terapéuticas recombinantes.

En determinadas realizaciones, los métodos de la presente divulgación pueden comprender el uso de un sistema de cultivo celular que se hace funcionar en modo de funcionamiento discontinuo o continuo. Por ejemplo, cuando se utilizan cultivos celulares discontinuos, pueden hacerse funcionar en modo de un único lote, semicontinuo o de lotes repetidos. Asimismo, los cultivos celulares continuos pueden hacerse funcionar en modo, por ejemplo, de perfusión, turbidostato o quimiostato. El cultivo celular discontinuo y continuo puede realizarse en condiciones de suspensión o adherencia. Cuando se hace funcionar en condiciones de suspensión, las células se suspenderán libremente y se mezclarán dentro del medio de cultivo. Alternativamente, en condiciones de adherencia, las células se unirán a una fase sólida, por ejemplo, un microportador, un microportador poroso, portador de disco, cartucho de cerámica, fibra hueca, lámina plana, matriz de gel, y similares.

Un cultivo discontinuo normalmente es un cultivo celular a gran escala en el que se cultiva un inóculo celular hasta una densidad máxima en un tanque o fermentador, y se recoge y se procesa como un solo lote. Un cultivo semicontinuo normalmente es un cultivo discontinuo al que se suministran nutrientes nuevos (por ejemplo, sustratos de limitación del crecimiento) o aditivos (por ejemplo, precursores para productos). La disolución de alimentación habitualmente está altamente concentrada para evitar la dilución del biorreactor. En un cultivo discontinuo repetido, las células se colocan en un medio de cultivo y se hacen crecer hasta una densidad celular deseada. Para evitar el comienzo de una fase de disminución y muerte celular, se diluye entonces el cultivo con medio de crecimiento completo antes de que las células alcancen su concentración máxima. La cantidad y la frecuencia de dilución varían ampliamente y depende de las características de crecimiento de la línea celular y de la conveniencia del procedimiento de cultivo. El procedimiento puede repetirse tantas veces como se requiera y, a menos que las células y el medio se desechen como subcultivo, el volumen del cultivo aumentará gradualmente a medida que se realiza cada dilución. El volumen creciente puede manejarse teniendo un reactor de tamaño suficiente como para permitir diluciones dentro del recipiente o dividiendo el cultivo diluido en varios recipientes. El fundamento de este tipo de cultivo es mantener las células en un estado de crecimiento exponencial. El subcultivo en serie se caracteriza

porque el volumen del cultivo siempre está creciendo gradualmente, puede haber múltiples recogidas, las células continúan creciendo y el procedimiento puede continuar durante tanto tiempo como se desee. En determinadas realizaciones, puede recubrirse una proteína ADAMTS recombinante (por ejemplo, ADAMTS13) tras recoger el sobrenadante de un cultivo discontinuo. En otras realizaciones, puede recubrirse un vWF recombinante tras la recogida del sobrenadante de un cultivo discontinuo.

Un cultivo continuo puede ser un cultivo en suspensión al que están suministrándose continuamente nutrientes mediante el flujo de entrada de medio nuevo, en el que el volumen de cultivo habitualmente se mantiene constante mediante la retirada simultánea del medio gastado. En los métodos de quimiostato y turbidostato, el medio extraído contiene células. Por tanto, las células que permanecen en el recipiente de cultivo celular deben crecer hasta mantener un estado estacionario. En el método de quimiostato, la tasa de crecimiento se controla normalmente controlando la tasa de dilución, es decir, la tasa a la que se añade medio nuevo. La tasa de crecimiento de las células en el cultivo puede controlarse, por ejemplo, a una tasa de crecimiento submáxima, mediante la alteración de la tasa de dilución. En contraposición, en el método de turbidostato, la tasa de dilución se fija para permitir la tasa de crecimiento máxima que pueden lograr las células en las condiciones de funcionamiento dadas, tales como pH y temperatura. En determinadas realizaciones, el rvWF o rA13 se recupera tras la recogida del sobrenadante de un cultivo continuo. Un método a modo de ejemplo para cultivo celular continuo se describe en el documento WO/2011/012725 (Grillberger *et al.*).

En un cultivo en perfusión, el medio extraído presenta reducción de células, que se retienen en el recipiente de cultivo, por ejemplo, mediante filtración o mediante métodos centrífugos que conducen a la reintroducción de las células en el cultivo. Sin embargo, normalmente las membranas usadas para la filtración no retienen el 100 % de las células, y por tanto se retira una proporción cuando se extrae el medio. Puede que no sea crucial hacer funcionar cultivos en perfusión a tasas de crecimiento muy altas, ya que la mayoría de las células quedan retenidas en el recipiente de cultivo. En determinadas realizaciones, el rvWF o rA13 se recupera tras la recogida del sobrenadante de un cultivo en perfusión.

El sistema de reactor de tanque con agitación puede usarse para cultivos celulares discontinuos y continuos que se hacen funcionar en modos en suspensión o adherente. Generalmente, el sistema de reactor de tanque con agitación puede hacerse funcionar como cualquier reactor de tanque con agitación convencional con cualquier tipo de agitador tal como un dispositivo Rushton, perfil hidrodinámico, pala con ajuste de paso o hélice.

En determinadas realizaciones, los métodos de cultivo celular de la divulgación pueden comprender el uso de un microportador. En algunas realizaciones, los cultivos celulares de las realizaciones pueden realizarse en grandes biorreactores en condiciones adecuadas para proporcionar áreas superficiales de cultivo específicas de alto volumen para lograr densidades celulares y expresión de proteínas altas. Un medio para proporcionar tales condiciones de crecimiento es usar microportadores para cultivo celular en biorreactores de tanque con agitación. El concepto de crecimiento celular en microportadores se describió por primera vez por van Wezel (van Wezel, A.I., *Nature* 216:64-5 (1967)) y permite la unión celular sobre la superficie de pequeñas partículas sólidas suspendidas en el medio de crecimiento. Estos métodos proporcionan altas razones de superficie con respecto a volumen y por tanto permiten la utilización de nutrientes eficaz. Además, para la expresión de proteínas secretadas en líneas de células eucariotas, la razón aumentada de superficie con respecto a volumen permite mayores niveles de secreción y por tanto mayores rendimientos de proteína en el sobrenadante del cultivo. Finalmente, estos métodos permiten la fácil ampliación a escala de cultivos de expresión en eucariotas.

Las células que expresan vWF y/o rA13 pueden unirse a un microportador esférico o poroso durante el crecimiento del cultivo celular. El microportador puede ser un microportador seleccionado del grupo de microportadores basados en dextrano, colágeno, plástico, gelatina y celulosa y otros tal como se describe en Butler (1988. En: Spier & Griffiths, *Animal cell Biotechnology* 3:283-303). También es posible hacer crecer las células hasta una biomasa sobre microportadores esféricos y subcultivar las células cuando han alcanzado la biomasa final del fermentador y antes de la producción de la proteína expresada sobre un microportador poroso o viceversa. Los microportadores esféricos adecuados pueden incluir microportadores de superficie lisa, tales como Cytodex™ 1, Cytodex™ 2, y Cytodex™ 3 (GE Healthcare) y microportadores macroporosos tales como Cytopore™ 1, Cytopore™ 2, Cytoline™ 1, y Cytoline™ 2 (GE Healthcare).

Tal como se describió anteriormente, la presente invención usa medios de cultivo celular que tienen una concentración de cobre aumentada. Se entiende que pueden aplicarse todas las realizaciones y concentraciones descritas en la sección de "medios de cultivo celular" anterior a los métodos de la presente divulgación descritos en el presente documento.

En determinadas realizaciones, el cultivo puede mantenerse durante al menos aproximadamente 7 días, o al menos aproximadamente 14 días, 21 días, 28 días, o al menos aproximadamente 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, o al menos aproximadamente 2 meses, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses o más. La densidad celular a la que se mantiene un cultivo celular para la producción de un vWF recombinante o una proteína rA13 recombinante dependerá de las condiciones de cultivo y del medio usado para la expresión de proteínas. Un experto en la técnica podrá determinar fácilmente la densidad celular óptima para un

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere adicionalmente a métodos para producir vWF en condiciones de cultivo celular que comprenden un medio de cultivo celular que tiene una concentración de cobre aumentada. En determinadas realizaciones, el cultivo también comprende una concentración de amonio baja. Tal como se usa en el presente documento, el término "cultivo celular" y "disolución de cultivo celular" se usan de manera intercambiable.

En una realización, la presente divulgación proporciona un método de producción de un vWF recombinante, de alto peso molecular, que comprende: a) proporcionar un cultivo de células; b) introducir una secuencia de ácido nucleico que codifica para vWF; c) seleccionar las células que portan la secuencia de ácido nucleico; y, d) expresar vWF en las células en condiciones de cultivo celular que comprenden un medio de cultivo celular que comprende una concentración de cobre de al menos 2,4 $\mu\text{g/l}$ y un sobrenadante de cultivo celular que comprende una concentración de amonio de menos de aproximadamente 4 mM, en el que el vWF es vWF altamente multimérico que comprende de aproximadamente 14 a aproximadamente 22 dímeros y una actividad de ristocetina específica de al menos aproximadamente 30 mU/ μg . En realizaciones adicionales, el rvWF multimérico producido utilizando los métodos de la presente divulgación comprende aproximadamente 10-30, 12-28, 14-26, 16-24, 18-22, 20-21 dímeros. Todavía en realizaciones adicionales, el rvWF producido según la presente divulgación tiene una actividad específica de al menos aproximadamente 20, 22,5, 25, 27,5, 30, 32,5, 35, 37,5, 40, 42,5, 45, 47,5, 50, 52,5, 55, 57,5, 60, 62,5, 65, 67,5, 70, 72,5, 75, 77,5, 80 o más mU/ μg . En una realización específica, la densidad celular del cultivo celular continuo para la producción de rvWF se mantiene a una concentración de no más de $2,5 \times 10^6$ células/ml durante un periodo prolongado. En otras realizaciones específicas, la densidad celular se mantiene a no más de $2,0 \times 10^6$ células/ml, $1,5 \times 10^6$ células/ml, $1,0 \times 10^6$ células/ml, $0,5 \times 10^6$ células/ml, o menos. En una realización, la densidad celular se mantiene a entre $1,5 \times 10^6$ células/ml y $2,5 \times 10^6$ células/ml.

En una realización, la presente divulgación proporciona un método para producir una composición de factor de von Willebrand recombinante (rvWF), comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar medios de cultivo celular basales; (b) complementar los medios de cultivo celular basales con cobre para proporcionar una concentración de cobre final de al menos 2,4 $\mu\text{g/l}$; (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica para una proteína rvWF; (d) cultivar la una o más células en los medios de cultivo celular complementados con cobre de manera que el rvWF se expresa en y se excreta de las células en un sobrenadante de cultivo; y (e) recuperar al menos una parte del sobrenadante de cultivo, en el que el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rvWF de al menos 30 mU/ μg de rvWF. En una realización preferida, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 4 mM. En otra realización específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 4 mM durante al menos 7 días. Aún en otras realizaciones, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos. Aún en otra realización, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a un nivel bajo durante la duración del procedimiento (es decir, durante todo el tiempo en que está usándose el cultivo para producir rvWF). En una realización preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rvWF de al menos 50 mU/ μg de rvWF. En una realización más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rvWF de al menos 70 mU/ μg de rvWF.

En una realización del método descrito anteriormente, los medios de cultivo celular basales se complementan con cobre para proporcionar una concentración de cobre final de al menos 2,4 $\mu\text{g/l}$. En una realización preferida, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 4 mM. En otra realización específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 4 mM durante al menos 7 días. Aún en otras realizaciones, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos. Aún en otra realización, la concentración de amonio de la disolución de cultivo celular se mantiene a un nivel bajo durante la duración del procedimiento (es decir, durante todo el tiempo en que está usándose el cultivo para producir rvWF). En una realización preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rvWF de al menos 50 mU/ μg de rvWF. En una realización más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rvWF de al menos 70 mU/ μg de rvWF.

En una realización del método descrito anteriormente, los medios de cultivo celular basales se complementan con cobre para proporcionar una concentración de cobre final de al menos 3 $\mu\text{g/l}$. En una realización preferida, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 4 mM. En otra realización específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 4 mM durante al menos 7 días. Aún en otras realizaciones, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos. Aún en otra realización, la concentración de amonio de la disolución de cultivo celular se mantiene a un nivel bajo durante la duración del procedimiento (es decir, durante todo el tiempo en que está usándose el cultivo para producir rvWF). En una realización preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rvWF de al menos 50 mU/ μg de rvWF. En una realización más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rvWF de al menos 70 mU/ μg de rvWF.

En una realización del método descrito anteriormente, los medios de cultivo celular basales se complementan con

cobre para proporcionar una concentración de cobre final de al menos 4 µg/l. En una realización preferida, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 4 mM. En otra realización específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 4 mM durante al menos 7 días. Aún en otras realizaciones, los medios de cultivo celular comprenden una concentración de amonio de no más de 3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos. Aún en otra realización, la concentración de amonio de la disolución de cultivo celular se mantiene a un nivel bajo durante la duración del procedimiento (es decir, durante todo el tiempo en que está usándose el cultivo para producir rvWF). En una realización preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rvWF de al menos 50 mU/µg de rvWF. En una realización más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rvWF de al menos 70 mU/µg de rvWF.

En una realización del método descrito anteriormente, los medios de cultivo celular basales se complementan con cobre para proporcionar una concentración de cobre final de aproximadamente 4,3 µg/l. En una realización preferida, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 4 mM. En otra realización específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 4 mM durante al menos 7 días. Aún en otras realizaciones, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos. Aún en otra realización, la concentración de amonio de la disolución de cultivo celular se mantiene a un nivel bajo durante la duración del procedimiento (es decir, durante todo el tiempo en que está usándose el cultivo para producir rvWF). En una realización preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rvWF de al menos 50 mU/µg de rvWF. En una realización más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rvWF de al menos 70 mU/µg de rvWF.

En una realización del método descrito anteriormente, los medios de cultivo celular basales se complementan con cobre para proporcionar una concentración de cobre final de entre 2,4 µg/l y 20 µg/l. En una realización preferida, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 4 mM. En otra realización específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 4 mM durante al menos 7 días. Aún en otras realizaciones, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos. Aún en otra realización, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a un nivel bajo durante la duración del procedimiento (es decir, durante todo el tiempo en que está usándose el cultivo para producir rvWF). En una realización preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rvWF de al menos 50 mU/µg de rvWF. En una realización más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rvWF de al menos 70 mU/µg de rvWF.

En una realización del método descrito anteriormente, los medios de cultivo celular basales se complementan con cobre para proporcionar una concentración de cobre final de entre 3 µg/l y 10 µg/l. En una realización preferida, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 4 mM. En otra realización específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 4 mM durante al menos 7 días. Aún en otras realizaciones, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos. Aún en otra realización, la concentración de amonio de la disolución de cultivo celular se mantiene a un nivel bajo durante la duración del procedimiento (es decir, durante todo el tiempo en que está usándose el cultivo para producir rvWF). En una realización preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rvWF de al menos 50 mU/µg de rvWF. En una realización más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rvWF de al menos 70 mU/µg de rvWF.

En una realización del método descrito anteriormente, los medios de cultivo celular basales se complementan con cobre para proporcionar una concentración de cobre final de entre 4 µg/l y 7,5 µg/l. En una realización preferida, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 4 mM. En otra realización específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 4 mM durante al menos 7 días. Aún en otras realizaciones, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos. Aún en otra realización, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a un nivel bajo durante la duración del procedimiento (es decir, durante todo el tiempo en que está usándose el cultivo para producir rvWF). En una realización preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rvWF de al menos 50 mU/µg de rvWF. En una realización más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rvWF de al menos 70 mU/µg de rvWF.

En una realización, la presente divulgación proporciona un método para producir una composición de factor de von Willebrand recombinante (rvWF), comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar medios de cultivo celular basales; (b) complementar los medios de cultivo celular basales con cobre; (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica para una proteína rvWF; (d) cultivar la una o más células en los medios de cultivo celular complementados con cobre de manera que el rvWF se expresa en y se excreta de las células en un sobrenadante de cultivo; y (e) recuperar al menos una parte del sobrenadante de cultivo, en el que la

menos 70 mU/ μ g de rvWF.

En una realización del método descrito anteriormente, la concentración de cobre y la concentración de NH_4^+ del cultivo celular se mantienen a una concentración según una cualquiera de las variaciones 1 a 440, tal como se expone en la tabla 1, siempre que la concentración de cobre sea de al menos 2,4 μ g/l y la concentración de NH_4^+ no sea mayor de 4 mM, durante al menos 9 semanas. En una realización preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rvWF de al menos 50 mU/ μ g de rvWF. En una realización más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rvWF de al menos 70 mU/ μ g de rvWF.

En una realización, la presente divulgación proporciona un método para producir una composición de factor de von Willebrand recombinante (rvWF), comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar medios de cultivo celular basales; (b) complementar los medios de cultivo celular basales con cobre para proporcionar una concentración de cobre final de al menos 2,4 μ g/l; (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica para una proteína rvWF; (d) cultivar la una o más células en los medios de cultivo celular complementados con cobre de manera que el rvWF se expresa en y se excreta de las células en un sobrenadante de cultivo; (e) monitorizar la concentración de amonio del sobrenadante de cultivo; y (f) recuperar al menos una parte del sobrenadante de cultivo, en el que el sobrenadante de cultivo que comprende una concentración de amonio de más de 4 mM no se usa para producir la composición de rvWF, y adicionalmente en el que el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rvWF de al menos 30 mU/ μ g de rvWF. En determinadas realizaciones, la concentración de cobre final de los medios de cultivo basales complementados es de al menos 2,4 μ g/l, 3 μ g/l, 4 μ g/l, 5 μ g/l, 6 μ g/l, 7 μ g/l, 8 μ g/l, 9 μ g/l, 10 μ g/l, 15 μ g/l, 20 μ g/l o mayor. En otras realizaciones, la concentración de cobre final de los medios de cultivo basales complementados es de entre 3-8 μ g/l o 4-6 μ g/l. En una realización preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rvWF de al menos 50 mU/ μ g de rvWF. En una realización más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rvWF de al menos 70 mU/ μ g de rvWF.

En una realización del método descrito anteriormente, no se usa sobrenadante de cultivo que comprende una concentración de amonio de más de 4 mM para producir la composición de rvWF. En determinadas realizaciones, la concentración de cobre final de los medios de cultivo basales complementados es de al menos 2,4 μ g/l, 3 μ g/l, 4 μ g/l, 5 μ g/l, 6 μ g/l, 7 μ g/l, 8 μ g/l, 9 μ g/l, 10 μ g/l, 15 μ g/l, 20 μ g/l o mayor. En otras realizaciones, la concentración de cobre final de los medios de cultivo basales complementados es de entre 3-8 μ g/l o 4-6 μ g/l. En una realización preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rvWF de al menos 50 mU/ μ g de rvWF. En una realización más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rvWF de al menos 70 mU/ μ g de rvWF.

Puede producirse vWF recombinante mediante la expresión en un sistema huésped eucariota adecuado. Los ejemplos de células eucariotas incluyen, sin limitación, células de mamífero, tales como CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep, y HepG2; células de insecto, por ejemplo, células SF9, células SF21, células S2 y células High Five; y células de levadura, por ejemplo, células de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*. En una realización, el vWF puede expresarse en células de levadura, células de insecto, células de ave, células de mamífero, y similares. Por ejemplo, en una línea celular humana, una línea celular de hámster, o una línea celular murina. En una realización particular, la línea celular es una línea celular CHO, BHK o HEK. Normalmente, pueden usarse células de mamífero, por ejemplo, células CHO de una línea celular continua, para expresar el vWF en la presente invención.

En determinadas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica para vWF puede ser un vector. El vector puede administrarse mediante un virus o puede ser un plásmido. La secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína puede ser un gen específico o una parte biológicamente funcional de la misma. En una realización, la proteína es al menos una parte biológicamente activa de vWF.

Puede usarse una amplia variedad de vectores para la expresión del vWF y pueden seleccionarse de vectores de expresión en eucariotas. Los ejemplos de vectores para expresión en eucariotas incluyen: (i) para la expresión en levadura, vectores tales como pAO, pPIC, pYES, pMET, usando promotores tales como AOX1, GAP, GAL1, AUG1, etc.; (ii) para la expresión en células de insecto, vectores tales como pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC, etc., usando promotores tales como PH, p10, MT, Ac5, OplE2, gp64, polh, etc., y (iii) para la expresión en células de mamífero, vectores tales como pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, pBPV, etc., y vectores derivados de sistemas virales tales como virus vaccinia, virus adenoasociados, virus del herpes, retrovirus, etc., usando promotores tales como CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV, y β -actina. Un vector a modo de ejemplo para expresar rvWF lo describe Kaufman *et al.* (Mol. Cell Biol. Marzo de 1989;9(3):1233-42).

En algunas realizaciones de la presente invención, la secuencia de ácido nucleico comprende además otras secuencias adecuadas para una expresión controlada de una proteína tal como secuencias promotoras, potenciadores, cajas TATA, sitios de iniciación de la transcripción, poliligadores, sitios de restricción, secuencias de poli-A, secuencias de procesamiento de proteínas, marcadores de selección, y similares que conoce generalmente un experto habitual en la técnica.

Además de los medios de cultivo celular que comprenden una concentración de cobre aumentada, las condiciones de cultivo celular usadas en la presente invención pueden incluir una concentración de amonio de menos de aproximadamente 4 mM por todo el procedimiento anterior en sistemas de cultivo.

En algunas realizaciones, las concentraciones de amonio de la presente invención se mantienen constantes por todo el procedimiento anterior del sistema de cultivo celular. Las células usadas según la presente invención pueden cultivarse, por ejemplo, mediante métodos que se modifican en comparación con el cultivo discontinuo y el cultivo semicontinuo convencionales, cada uno de los cuales se conocen generalmente en el campo. Sin embargo, tales técnicas convencionales pueden producir altas concentraciones de amonio al final del cultivo. Los métodos de la presente divulgación superan este problema empleando sistemas de producción que pueden proporcionar un suministro continuo de medios de cultivo a través de técnicas tales como, por ejemplo, cultivos de perfusión o quimiostato. Tras el cultivo de las células huésped, el vWF puede recuperarse del medio empleado usando metodologías convencionales, tales como ultrafiltración o centrifugación. Si se desea, el vWF puede purificarse, por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio iónico y/o de exclusión molecular, y similares.

Un cultivo continuo (por ejemplo, un cultivo de perfusión o quimiostato) puede ser un cultivo en suspensión al que están suministrándose continuamente nutrientes mediante el flujo de entrada de medio nuevo, en el que el volumen de cultivo habitualmente es constante. De manera similar, la fermentación continua puede referirse a un procedimiento en el que las células o los microorganismos se mantienen en cultivo en la fase de crecimiento exponencial mediante la adición continua de medio nuevo que se equilibra exactamente por la retirada de la suspensión celular del biorreactor. Además, puede usarse un sistema de reactor de tanque con agitación para cultivos en suspensión, de perfusión, quimiostáticos y/o de microportador. Generalmente, el sistema de reactor de tanque con agitación puede hacerse funcionar como cualquier reactor de tanque con agitación convencional con cualquier tipo de agitador tal como un dispositivo Rushton, perfil hidrodinámico, pala con ajuste de paso o hélice.

C. Métodos de producción de ADAMTS13 recombinante (A13)

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere además a métodos para producir rA13 en condiciones de cultivo celular que comprenden un medio de cultivo celular que tiene una concentración de cobre aumentada. En determinadas realizaciones, el cultivo también comprende una concentración de amonio baja.

En una realización, la presente divulgación proporciona un método para producir una composición de ADAMTS13 recombinante (rA13), comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar medios de cultivo celular basales; (b) complementar los medios de cultivo celular basales con cobre para proporcionar una concentración de cobre final de al menos 1,0 µg/l; (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica para una proteína rA13; (d) cultivar la una o más células en los medios de cultivo celular complementados con cobre de manera que rA13 se expresa en y se excreta de las células en un sobrenadante de cultivo; y (e) recuperar al menos una parte del sobrenadante de cultivo, en el que están presentes al menos 1500 unidades de actividad mediante FRETS-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día (es decir, 1500 unidades de actividad mediante FRETS-vWF73 por día por litro de cultivo celular; P FRETS) en el sobrenadante de cultivo recuperado. En determinadas realizaciones, la concentración de cobre final de los medios de cultivo basales complementados es de al menos 2 µg/l, 3 µg/l, 4 µg/l, 5 µg/l, 6 µg/l o mayor. En otras realizaciones, la concentración de cobre final de los medios de cultivo basales complementados es de entre 1-6 µg/l, 2-5 µg/l, 2-4 µg/l o 3-4 µg/l. En una realización preferida, están presentes al menos 2000 unidades de actividad mediante FRETS-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una realización más preferida, están presentes al menos 2500 unidades de actividad mediante FRETS-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado. En la realización más preferida, están presentes al menos 3000 unidades de actividad mediante FRETS-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado. En determinadas realizaciones, los métodos proporcionan productividad volumétrica mediante FRETS-vWF73 mejorada (P FRETS). Por ejemplo, en determinadas realizaciones, se recuperan diariamente al menos 1500 unidades de actividad mediante FRETS-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados durante al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más días. En una realización preferida, se recuperan diariamente al menos 2000 unidades de actividad mediante FRETS-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados durante al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más días. En una realización más preferida, se recuperan diariamente al menos 2500 unidades de actividad mediante FRETS-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados durante al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más días. En la realización más preferida, se recuperan diariamente al menos 3000 unidades de actividad mediante FRETS-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados durante al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más días. En una realización específica, la densidad celular del cultivo celular continuo para la producción de rA13 se mantiene a una concentración de no más de $4,0 \times 10^6$ células/ml durante un periodo prolongado. En otras realizaciones específicas, la densidad celular se mantiene a no más de $3,5 \times 10^6$ células/ml, $3,0 \times 10^6$ células/ml, $2,5 \times 10^6$ células/ml, $2,0 \times 10^6$ células/ml, $1,5 \times 10^6$ células/ml, $1,0 \times 10^6$ células/ml, o menos. En una realización, la densidad celular se mantiene a entre $3,0 \times 10^6$ células/ml y $4,0 \times 10^6$ células/ml.

En una realización de los métodos descritos anteriormente, el sobrenadante recuperado tiene al menos 4 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por ml de sobrenadante (FRETs). En una realización preferida, el sobrenadante recuperado tiene al menos 6 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por ml de sobrenadante.

En una realización más preferida, el sobrenadante recuperado tiene al menos 8 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por ml de sobrenadante. En la realización más preferida, el sobrenadante recuperado tiene al menos 10 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por ml de sobrenadante. En determinadas realizaciones, los métodos proporcionan producción de FRETs mejorada de manera sostenible. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, se recupera diariamente sobrenadante que tiene al menos 4 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por ml durante al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 o más días. En una realización preferida, se recupera diariamente sobrenadante que tiene al menos 6 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por ml durante al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 o más días. En una realización más preferida, se recupera diariamente sobrenadante que tiene al menos 8 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por ml durante al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 o más días. En la realización más preferida, se recupera diariamente sobrenadante que tiene al menos 10 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por ml durante al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 o más días.

En una realización de los métodos descritos anteriormente, el cultivo celular da como resultado la producción de al menos 800 mU de actividad mediante FRETs-vWF73 por 10^6 células presentes en el cultivo por día (es decir, q FRETs). En una realización preferida, el cultivo celular da como resultado la producción de al menos 1 U de actividad mediante FRETs-vWF73 por 10^6 células presentes en el cultivo por día. En una realización más preferida, el cultivo celular da como resultado la producción de al menos 1,2 U de actividad mediante FRETs-vWF73 por 10^6 células presentes en el cultivo por día. En la realización más preferida, el cultivo celular da como resultado la producción de al menos 1,4 U de actividad mediante FRETs-vWF73 por 10^6 células presentes en el cultivo por día.

En determinadas realizaciones, los métodos proporcionan productividad mediante FRETs-vWF73 específica de célula (q FRETs) mejorada de manera sostenible. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el cultivo celular da como resultado la producción de al menos 800 mU de actividad mediante FRETs-vWF73 por 10^6 células presentes en el cultivo diariamente durante al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 o más días. En una realización preferida, el cultivo celular da como resultado la producción de al menos 1 U de actividad mediante FRETs-vWF73 por 10^6 células presentes en el cultivo diariamente durante al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 o más días. En una realización más preferida, el cultivo celular da como resultado la producción de al menos 1,2 U de actividad mediante FRETs-vWF73 por 10^6 células presentes en el cultivo diariamente durante al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 o más días. En la realización más preferida, el cultivo celular da como resultado la producción de al menos 1,4 U de actividad mediante FRETs-vWF73 por 10^6 células presentes en el cultivo diariamente durante al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 o más días.

En una realización de los métodos descritos anteriormente, el cultivo celular da como resultado la producción de al menos 1 mg de rA13, tal como se mide mediante ELISA, por litro de cultivo por día (P ELISA). En una realización preferida, el cultivo celular da como resultado la producción de al menos 1,5 mg de rA13, tal como se mide mediante ELISA, por litro de cultivo por día. En una realización más preferida, el cultivo celular da como resultado la producción de al menos 2 mg de rA13, tal como se mide mediante ELISA, por litro de cultivo por día. En determinadas realizaciones, los métodos proporcionan producción de rA13 mejorada de manera sostenible. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el cultivo celular da como resultado la producción de al menos 1 mg de rA13, tal como se mide mediante ELISA, por litro de cultivo diariamente durante al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 o más días. En una realización preferida, el cultivo celular da como resultado la producción de al menos 1,5 mg de rA13, tal como se mide mediante ELISA, por litro de cultivo diariamente durante al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 o más días. En una realización más preferida, el cultivo celular da como resultado la producción de al menos 2 mg de rA13, tal como se mide mediante ELISA, por litro de cultivo diariamente durante al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 o más días.

En una realización de los métodos descritos anteriormente, el cultivo celular da como resultado la producción de al menos 0,5 μ g de rA13, tal como se mide mediante ELISA, por 10^6 células presentes en el cultivo por día (es decir, q ELISA). En una realización preferida, el cultivo celular da como resultado la producción de al menos 0,7 μ g de rA13, tal como se mide mediante ELISA, por 10^6 células presentes en el cultivo por día. En una realización más preferida, el cultivo celular da como resultado la producción de al menos 0,9 μ g de rA13, tal como se mide mediante ELISA, por 10^6 células presentes en el cultivo por día. En determinadas realizaciones, los métodos proporcionan producción mediante q ELISA mejorada de manera sostenible. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el cultivo celular da como resultado la producción de al menos 0,5 μ g de rA13, tal como se mide mediante ELISA, por 10^6 células presentes en el cultivo diariamente durante al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 o más días. En una realización preferida, el cultivo celular da como resultado la producción de al menos 0,7 μ g de rA13, tal como se mide mediante ELISA, por 10^6 células presentes en el cultivo diariamente durante al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 o más días. En una realización más preferida, el cultivo celular da como resultado la producción de al menos 0,9 μ g de rA13, tal como se mide mediante ELISA, por 10^6 células presentes en el cultivo diariamente durante al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 o más días.

En una realización de los métodos descritos anteriormente, el sobrenadante recuperado tiene al menos 3 μg de rA13, tal como se mide mediante ELISA, por ml de sobrenadante. En una realización preferida, el sobrenadante recuperado tiene al menos 4 μg de rA13, tal como se mide mediante ELISA, por ml de sobrenadante. En una realización más preferida, el sobrenadante recuperado tiene al menos 5 μg de rA13, tal como se mide mediante ELISA, por ml de sobrenadante. En la realización más preferida, el sobrenadante recuperado tiene al menos 6 μg de rA13, tal como se mide mediante ELISA, por ml de sobrenadante. En determinadas realizaciones, los métodos proporcionan producción de rA13 mejorada de manera sostenible. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, se recupera sobrenadante que tiene al menos 3 μg de rA13 por ml diariamente durante al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 o más días. En una realización preferida, se recupera sobrenadante que tiene al menos 4 μg de rA13 por ml diariamente durante al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 o más días. En una realización más preferida, se recupera sobrenadante que al menos 5 μg de rA13 por ml diariamente durante al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 o más días. En la realización más preferida, se recupera sobrenadante que tiene al menos 6 μg de rA13 por ml diariamente durante al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 o más días.

En una realización de los métodos descritos anteriormente, la disolución de cultivo celular comprende además una concentración de amonio de menos de 10 mM. En otra realización específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 10 mM durante al menos 7 días. En una realización preferida, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 5 mM. En otra realización específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 5 mM durante al menos 7 días. En una realización preferida, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 4 mM. En otra realización específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 4 mM durante al menos 7 días. Aún en otras realizaciones, la disolución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 10 mM, o no más de 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos. Aún en otra realización, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a un nivel bajo durante la duración del procedimiento (es decir, durante todo el tiempo en que está usándose el cultivo para producir rA13). En una realización particular, la disolución de cultivo tiene una concentración de cobre y amonio según una cualquiera de las variaciones 1 a 440, tal como se proporciona en la tabla 1.

En una realización, la presente divulgación proporciona un método para producir una composición de ADAMTS13 recombinante (rA13), comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar medios de cultivo celular basales; (b) complementar los medios de cultivo celular basales con cobre y cinc; (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica para una proteína rA13; (d) cultivar la una o más células en los medios de cultivo celular complementados con cobre de manera que rA13 se expresa en y se excreta de las células en un sobrenadante de cultivo; y (e) recuperar al menos una parte del sobrenadante de cultivo, en el que están presentes al menos 1500 unidades de actividad mediante FRETS-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una realización, el medio de cultivo contiene al menos cobre 1 $\mu\text{g/l}$ y al menos cinc 2 μM . En otras realizaciones, los medios contienen al menos cobre 2 $\mu\text{g/l}$ o al menos cobre 4 $\mu\text{g/l}$. En una realización en la que los medios se complementan con cobre, el medio de cultivo también contiene cinc al menos a o aproximadamente 5 μM . En una realización, el medio de cultivo también contiene cinc a o aproximadamente entre 2 μM y 12 μM . En otra realización, el medio de cultivo también contiene cinc a o aproximadamente entre 5 μM y 12 μM . Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo también puede contener cinc al menos a o aproximadamente 2 μM , o al menos a o aproximadamente 3 μM , 4 μM , 5 μM , 6 μM , 7 μM , 8 μM , 9 μM , 10 μM , 11 μM , 12 μM , 13 μM , 14 μM , 15 μM , 20 μM , 25 μM , 30 μM o más. En una realización, el medio de cultivo contiene una concentración de cobre y cinc según una cualquiera de las variaciones 441 a 880, tal como se expone en la tabla 2. En una realización preferida, están presentes al menos 2000 unidades de actividad mediante FRETS-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una realización más preferida, están presentes al menos 2500 unidades de actividad mediante FRETS-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado. En la realización más preferida, están presentes al menos 3000 unidades de actividad mediante FRETS-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado.

En una realización, la presente divulgación proporciona un método para producir una composición de ADAMTS13 recombinante (rA13), comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar medios de cultivo celular basales; (b) complementar los medios de cultivo celular basales con cobre y calcio; (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica para una proteína rA13; (d) cultivar la una o más células en los medios de cultivo celular complementados con cobre de manera que rA13 se expresa en y se excreta de las células en un sobrenadante de cultivo; y (e) recuperar al menos una parte del sobrenadante de cultivo, en el que están presentes al menos 1500 unidades de actividad mediante FRETS-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una realización, el medio de cultivo contiene al menos cobre 1 $\mu\text{g/l}$ y al menos calcio 0,5 mM. En otras realizaciones, los medios contienen al menos cobre 2 $\mu\text{g/l}$ o al menos cobre 4 $\mu\text{g/l}$. En otra realización en la que los medios se complementan con cobre, el medio de cultivo

también contiene al menos calcio 1,5 mM. En una realización, el medio de cultivo contiene calcio a o aproximadamente entre 0,5 mM y 1,5 mM. Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo puede contener calcio al menos a o aproximadamente 0,5 mM, o al menos a o aproximadamente 0,6 mM, 0,7 mM, 0,8 mM, 0,9 mM, 1,0 mM, 1,1 mM, 1,2 mM, 1,3 mM, 1,4 mM, 1,5 mM, 1,6 mM, 1,7 mM, 1,8 mM, 1,9 mM, 2,0 mM, 2,25 mM, 2,5 mM, 2,75 mM, 3,0 mM, 3,5 mM, 4,0 mM, 4,5 mM, 5,0 mM o más. En una realización, el medio de cultivo contiene una concentración de cobre y calcio según una cualquiera de las variaciones 881 a 1320, tal como se expone en la tabla 3. En una realización preferida, están presentes al menos 2000 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una realización más preferida, están presentes al menos 2500 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado. En la realización más preferida, están presentes al menos 3000 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado.

En una realización, la presente divulgación proporciona un método para producir una composición de ADAMTS13 recombinante (rA13), comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar medios de cultivo celular basales; (b) complementar los medios de cultivo celular basales con cobre, cinc y calcio; (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica para una proteína rA13; (d) cultivar la una o más células en los medios de cultivo celular complementados con cobre de manera que rA13 se expresa en y se excreta de las células en un sobrenadante de cultivo; y (e) recuperar al menos una parte del sobrenadante de cultivo, en el que están presentes al menos 1500 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una realización, el medio de cultivo tiene una concentración de calcio de al menos 0,5 mM y una concentración de cobre y cinc según una cualquiera de las variaciones 441 a 880, tal como se expone en la tabla 2. En otra realización específica, el medio de cultivo tiene una concentración de calcio de al menos 1,5 mM y una concentración de cobre y cinc según una cualquiera de las variaciones 441 a 880, tal como se expone en la tabla 2. En otra realización específica, el medio de cultivo tiene una concentración de calcio de entre 0,5 mM y 1,5 mM y una concentración de cobre y cinc según una cualquiera de las variaciones 441 a 880, tal como se expone en la tabla 2. Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo tiene una concentración de calcio de al menos 0,6 mM, 0,7 mM, 0,8 mM, 0,9 mM, 1,0 mM, 1,1 mM, 1,2 mM, 1,3 mM, 1,4 mM, 1,5 mM, 1,6 mM, 1,7 mM, 1,8 mM, 1,9 mM, 2,0 mM, 2,25 mM, 2,5 mM, 2,75 mM, 3,0 mM, 3,5 mM, 4,0 mM, 4,5 mM, 5,0 mM, o más, y una concentración de cobre y cinc según una cualquiera de las variaciones 441 a 880, tal como se expone en la tabla 2. En una realización preferida, están presentes al menos 2000 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una realización más preferida, están presentes al menos 2500 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado. En la realización más preferida, están presentes al menos 3000 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado.

En una realización, la presente divulgación proporciona un método para producir una composición de ADAMTS13 recombinante (rA13), comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar medios de cultivo celular basales; (b) complementar los medios de cultivo celular basales con cobre y nicotinamida; (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica para una proteína rA13; (d) cultivar la una o más células en los medios de cultivo celular complementados con cobre de manera que rA13 se expresa en y se excreta de las células en un sobrenadante de cultivo; y (e) recuperar al menos una parte del sobrenadante de cultivo, en el que están presentes al menos 1500 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una realización, el medio de cultivo contiene al menos cobre 1 µg/l y al menos nicotinamida 2 mg/l (vitamina B3). En otras realizaciones, los medios contienen al menos cobre 2 µg/l o al menos cobre 4 µg/l. En otra realización en la que los medios se complementan con cobre, el medio de cultivo también contiene al menos nicotinamida 7 mg/l (vitamina B3). En una realización, el medio de cultivo contiene nicotinamida a o aproximadamente entre 2 mg/l y 10 mg/l (vitamina B3). Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo puede contener nicotinamida al menos a o aproximadamente 2 mg/l, 3 mg/l, 4 mg/l, 5 mg/l, 6 mg/l, 7 mg/l, 8 mg/l, 9 mg/l, 10 mg/l, 15 mg/l, 20 mg/l, o concentraciones mayores de nicotinamida (vitamina B3). En una realización, el medio de cultivo contiene una concentración de cobre y nicotinamida según una cualquiera de las variaciones 1321 a 1760, tal como se expone en la tabla 4. En una realización preferida, están presentes al menos 2000 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una realización más preferida, están presentes al menos 2500 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado. En la realización más preferida, están presentes al menos 3000 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado.

En una realización, la presente divulgación proporciona un método para producir una composición de ADAMTS13 recombinante (rA13), comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar medios de cultivo celular basales; (b) complementar los medios de cultivo celular basales con cobre, cinc y nicotinamida; (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica para una proteína rA13; (d) cultivar la una o más células en los medios de cultivo celular complementados con cobre de manera que rA13 se expresa en y se excreta de las

células en un sobrenadante de cultivo; y (e) recuperar al menos una parte del sobrenadante de cultivo, en el que están presentes al menos 1500 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una realización, el medio de cultivo celular tiene una concentración de nicotinamida de al menos 2 mg/ml y una concentración de cobre y cinc según una cualquiera de las variaciones 441 a 880, tal como se expone en la tabla 2. En otra realización específica, el medio de cultivo tiene una concentración de nicotinamida de al menos 7 mg/ml mM y una concentración de cobre y cinc según una cualquiera de las variaciones 441 a 880, tal como se expone en la tabla 2. En otra realización específica, el medio de cultivo tiene una concentración de nicotinamida de entre 2 mg/ml y 10 mg/ml y una concentración de cobre y cinc según una cualquiera de las variaciones 441 a 880, tal como se expone en la tabla 2. Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo tiene una concentración de nicotinamida de al menos 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13 mg/ml, 14 mg/ml, 15 mg/ml, o más, y una concentración de cobre y cinc según una cualquiera de las variaciones 441 a 880, tal como se expone en la tabla 2. En una realización preferida, están presentes al menos 2000 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una realización más preferida, están presentes al menos 2500 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado. En la realización más preferida, están presentes al menos 3000 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado.

En una realización, la presente divulgación proporciona un método para producir una composición de ADAMTS13 recombinante (rA13), comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar medios de cultivo celular basales; (b) complementar los medios de cultivo celular basales con cobre, calcio y nicotinamida; (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica para una proteína rA13; (d) cultivar la una o más células en los medios de cultivo celular complementados con cobre de manera que rA13 se expresa en y se excreta de las células en un sobrenadante de cultivo; y (e) recuperar al menos una parte del sobrenadante de cultivo, en el que están presentes al menos 1500 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una realización, el medio de cultivo celular tiene una concentración de nicotinamida de al menos 2 mg/ml y una concentración de cobre y calcio según una cualquiera de las variaciones 881 a 1320, tal como se expone en la tabla 3. En otra realización específica, el medio de cultivo tiene una concentración de nicotinamida de entre 2 mg/ml y 10 mg/ml y una concentración de cobre y calcio según una cualquiera de las variaciones 881 a 1320, tal como se expone en la tabla 3. Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo tiene una concentración de nicotinamida de al menos 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13 mg/ml, 14 mg/ml, 15 mg/ml, o más, y una concentración de cobre y calcio según una cualquiera de las variaciones 881 a 1320, tal como se expone en la tabla 3. En una realización preferida, están presentes al menos 2000 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una realización más preferida, están presentes al menos 2500 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado. En la realización más preferida, están presentes al menos 3000 unidades de actividad mediante FRETs-vWF73 por litro de medios de cultivo celular basales complementados por día en el sobrenadante de cultivo recuperado.

Pueden producirse proteínas ADAMTS recombinantes mediante la expresión en cualquier sistema huésped procariota o eucariota adecuado. Los ejemplos de células eucariotas incluyen, sin limitación, células de mamífero, tales como CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep y HepG2; células de insecto, por ejemplo, células SF9, células SF21, células S2 y células High Five; y células de levadura, por ejemplo, células de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*. En una realización, las proteínas ADAMTS pueden expresarse en células bacterianas, células de levadura, células de insecto, células de ave, células de mamífero, y similares. Por ejemplo, en una línea celular humana, una línea celular de hámster o una línea celular murina. En una realización particular, la línea celular es una línea celular CHO, BHK o HEK. En una realización preferida, la línea celular es una línea celular CHO. En una realización específica, se preparan clones de CHO capaces de expresar de manera estable rA13 cotransfectando una célula CHO con secuencias codificantes para rA13 y una dihidrofolato reductasa (por ejemplo, un gen de dhfr murino) y seleccionado para crecimiento en presencia de niveles crecientes de metotrexato

En una realización, las células pueden ser células de mamífero que pueden cultivarse, preferiblemente en un procedimiento de fabricación (es decir, al menos 10 litros, preferiblemente al menos 100 litros), para producir una proteína ADAMTS deseada tal como ADAMTS13. Los ejemplos incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada mediante SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (células 293 ó 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol., 36:59 (1977)); células de riñón de hámster recién nacido (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/DHFR, tal como el subclón DUKX-B11 (CHO, Uriaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod, 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de cáncer de cuello uterino humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de riñón de perro (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442);

células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N. Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y la línea de hepatoma humano (Hep G2). Preferiblemente, la línea celular es una línea celular de roedor, especialmente una línea celular de hámster tal como CHO o BHK.

Puede usarse una amplia variedad de vectores para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) y pueden seleccionarse de vectores de expresión en eucariotas y procariotas. En determinadas realizaciones, se contempla un vector de plásmido para su uso en la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13). En general, se usan vectores de plásmido que contienen secuencias de replicón y de control que se derivan de especies compatibles con la célula huésped en relación con esos huéspedes. El vector puede portar un sitio de replicación, así como secuencias de marcaje que pueden proporcionar selección fenotípica en células transformadas. El plásmido comprenderá una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) unida operativamente a una o más secuencias de control, por ejemplo, un promotor.

Un método preferido de preparación de clones de células CHO estables que expresan una proteína ADAMTS recombinante es tal como sigue. Se transfecta una línea celular CHO deficiente en DHFR, DUKX-B 11, con un vector de expresión de DHFR para permitir la expresión de la proteína recombinante relevante. Un método a modo de ejemplo se describe en Plaimauer *et al.* (Blood, 15 de noviembre de 2002;100(10):3626-32. Epub 12 de julio de 2002)). Se lleva a cabo la selección mediante crecimiento en medios libres de hipoxantina/timidina (HT) y se logra la amplificación de la región relevante que codifica para la expresión de la proteína ADAMTS recombinante y el gen de DHFR mediante la propagación de las células en concentraciones crecientes de metotrexato. Cuando resulta apropiado, las líneas celulares CHO pueden adaptarse para crecimiento en medio libre de suero y/o proteínas, esencialmente tal como se describe en el documento US 6.100.061 (Reiter *et al.*, Immuno Aktiengesellschaft).

En otra realización preferida, se preparan células HEK293 estables transfectando con un constructo que contiene un marcador seleccionable de higromicina y seleccionando transformantes mediante resistencia a antibióticos.

La capacidad de determinados virus para infectar células o para entrar en células a través de endocitosis mediada por receptor y para integrarse en el genoma de la célula huésped y expresar genes virales de manera estable y eficaz ha hecho de ellos candidatos atractivos para la transferencia de ácidos nucleicos extraños al interior de células (por ejemplo, células de mamífero). Por consiguiente, en determinadas realizaciones, se usa un vector viral para introducir una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en una célula huésped para su expresión. El vector viral comprenderá una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) unida operativamente a una o más secuencias de control, por ejemplo, un promotor. Alternativamente, el vector viral puede no contener una secuencia de control y en cambio se basará en una secuencia de control dentro de la célula huésped para dirigir la expresión de la proteína ADAMTS. Los ejemplos no limitativos de vectores virales que pueden usarse para suministrar un ácido nucleico incluyen vectores adenovirales, vectores de VAA y vectores retrovirales.

En una realización, un vector de expresión de adenovirus incluye aquellos constructos que contienen secuencias de adenovirus suficientes para soportar el empaquetamiento del constructo y en última instancia para expresar un constructo de ADAMTS que se ha clonado en el mismo. Los vectores adenovirales permiten la introducción de secuencias extrañas de hasta 7 kb (Grunhaus *et al.*, Seminar in Virology, 200(2):535-546, 1992)).

En otra realización, puede usarse un virus adenoasociado (VAA) para introducir una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en una célula huésped para su expresión. Los sistemas de VAA se han descrito anteriormente y generalmente se conocen bien en la técnica (Kelleher y 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). Detalles relativos a la generación y el uso de vectores de VAA se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 5.139.941 y 4.797.368,

En una realización, puede usarse un vector de expresión retroviral para introducir una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en una célula huésped para su expresión. Estos sistemas se han descrito anteriormente y generalmente se conocen bien en la técnica (Mann *et al.*, Cell, 33:153-159, 1983; Nicolas y Rubinstein, En: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, Rodriguez y Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, págs. 494-513, 1988; Temin, En: Gene Transfer, Kucherlapati (ed.), Nueva York: Plenum Press, págs. 149-188, 1986). En una realización específica, el vector retroviral es un vector lentiviral (véase, por ejemplo, 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; patentes estadounidenses n.ºs 6.013.516 y 5.994.136).

Los ejemplos no limitativos de vectores para expresión en procariotas incluyen plásmidos tales como pRSET, pET, pBAD, etc., en los que los promotores usados en vectores de expresión en procariotas incluyen lac, trc, trp, recA, araBAD, etc. Los ejemplos de vectores para expresión en eucariotas incluyen: (i) para la expresión en levaduras, vectores tales como pAO, pPIC, pYES, pMET, usando promotores tales como AOX1, GAP, GAL1, AUG1, etc.; (ii)

para la expresión en células de insecto, vectores tales como pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC, etc., usando promotores tales como PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh, etc., y (iii) para la expresión en células de mamífero, vectores tales como pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, pBPV, etc., y vectores derivados de sistemas virales tales como virus vaccinia, virus adenoasociados, herpesvirus, retrovirus, etc., usando promotores tales como de CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV y β -actina. Un vector a modo de ejemplo para expresar rA13 lo describen Plaimauer *et al.* (Blood. 15 de noviembre de 2002;100(10):3626-32. Epub 12 de julio de 2002).

En determinadas realizaciones, los métodos de cultivo celular de la divulgación pueden comprender el uso de un microportador. La presente divulgación proporciona, entre otros aspectos, métodos de expresión de la proteína ADAMTS a gran escala. En algunas realizaciones, los cultivos celulares de las realizaciones pueden realizarse en grandes biorreactores en condiciones adecuadas para proporcionar áreas superficiales de cultivo específicas de alto volumen para lograr densidades celulares y expresión de proteínas altas. Un medio para proporcionar tales condiciones de crecimiento es usar microportadores para cultivo celular en biorreactores de tanque con agitación. En otra realización, estos requisitos de crecimiento se cumplen a través del uso de un cultivo celular en suspensión.

V. Realizaciones específicas

A. Factor de von Willebrand recombinante (rvWF)

El vWF recombinante puede expresarse en células de mamífero, pero la actividad específica del vWF puede variar ampliamente dependiendo de las condiciones de cultivo celular y no se ha demostrado que sea comparable o igual a la del vWF aislado de plasma sanguíneo. La presente invención se basa en parte en el resultado sorprendente de que los medios de cultivo celular que tienen al menos 2,4 $\mu\text{g/l}$ de cobre proporcionan un efecto ventajoso de promover la expresión de vWF de alto peso molecular que tiene una alta actividad específica. En particular, el vWF recombinante de alto peso molecular en la presente invención pueden incluir una forma altamente multimérica que comprende de aproximadamente 14 a aproximadamente 22 dímeros y una actividad de ristocetina específica de al menos aproximadamente 30 mU/ μg . Los procedimientos de cultivo celular según la presente divulgación también permiten mantener bajos niveles de NH_4^+ (menos de 4 mM) durante el procedimiento anterior en sistemas de cultivo celular, reduciendo de ese modo los efectos perjudiciales para modificaciones postraduccionales. Se cree que la presente divulgación proporciona por primera vez condiciones de cultivo celular que comprenden un medio que tiene una concentración de cobre adecuada en combinación con niveles apropiados de amonio en el sobrenadante para expresar un vWF altamente multimérico con una alta actividad específica.

En un aspecto, la presente invención se refiere a condiciones de cultivo celular para producir vWF recombinante, de alto peso molecular con una alta actividad específica. Las condiciones de cultivo celular de la presente invención pueden incluir, por ejemplo, un medio de cultivo celular con una concentración de cobre aumentada y/o sobrenadante de cultivo celular con una concentración de amonio (NH_4^+) baja. La presente invención también proporciona métodos para cultivar células en condiciones de cultivo celular para expresar un vWF de alto peso molecular con una alta actividad específica.

En un aspecto, la presente invención proporciona una disolución de cultivo celular para producir proteína vWF recombinante, de alto peso molecular, comprendiendo la disolución de cultivo celular: un medio de cultivo celular que comprende una concentración de cobre de al menos 2,4 $\mu\text{g/l}$; un sobrenadante de cultivo celular que comprende una concentración de amonio de menos de 4 mM; y una pluralidad de células que expresan proteína vWF altamente multimérica, en la que la proteína vWF comprende una actividad de ristocetina específica de al menos aproximadamente 30 mU/ μg .

En una realización específica de los cultivos celulares descritos anteriormente, la disolución de cultivo celular comprende un complemento de medio que comprende cobre.

En una realización específica de los cultivos celulares descritos anteriormente, el complemento de medio comprende un hidrolizado, opcionalmente un hidrolizado de soja.

En una realización específica de los cultivos celulares descritos anteriormente, el complemento de medio comprende una sal de cobre, un quelato de cobre, o una combinación de los mismos.

En una realización específica de los cultivos celulares descritos anteriormente, la sal de cobre se selecciona del grupo que consiste en sulfato de cobre, acetato de cobre, carbonato de cobre, cloruro de cobre, hidróxido de cobre, nitrato de cobre y óxido de cobre.

En una realización específica de los cultivos celulares descritos anteriormente, la concentración de cobre es de al menos aproximadamente 4 $\mu\text{g/l}$.

En una realización específica de los cultivos celulares descritos anteriormente, la concentración de cobre es de desde aproximadamente 2,4 $\mu\text{g/l}$ hasta aproximadamente 20 $\mu\text{g/l}$.

En una realización específica de los cultivos celulares descritos anteriormente, la proteína vWF comprende de aproximadamente 14 a aproximadamente 22 dímeros.

- 5 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método de producción de una proteína vWF recombinante, de alto peso molecular, comprendiendo el método las etapas de: a) proporcionar un cultivo de células que comprende un ácido nucleico que codifica para proteína vWF recombinante; b) expresar la proteína vWF en las células en condiciones de cultivo celular que comprenden un medio de cultivo celular que comprende una concentración de cobre de al menos 2,4 $\mu\text{g/l}$ y un sobrenadante de cultivo celular que comprende una concentración de amonio de
- 10 menos de aproximadamente 4 mM, en el que la proteína vWF es proteína vWF altamente multimérica y comprende una actividad de ristocetina específica de al menos aproximadamente 30 mU/ μg .

En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, las células son células de mamífero.

- 15 En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, las células son de una línea celular continua.

En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, las células son células CHO.

- 20 En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, la concentración de cobre es de al menos aproximadamente 4 $\mu\text{g/l}$.

En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, la concentración de cobre es de desde aproximadamente 2,4 $\mu\text{g/l}$ hasta aproximadamente 20 $\mu\text{g/l}$.

- 25 En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, la proteína vWF recombinante tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica de al menos aproximadamente 50 mU/ μg .

- En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, la proteína vWF recombinante tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica de desde aproximadamente 30 mU/ μg hasta aproximadamente
- 30 100 mU/ μg .

En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, la proteína vWF recombinante comprende de aproximadamente 14 a aproximadamente 22 dímeros.

- 35 En un aspecto, la presente invención proporciona una proteína vWF recombinante, de alto peso molecular producida mediante un procedimiento, comprendiendo el procedimiento las etapas de: a) proporcionar un cultivo de células que comprende un ácido nucleico que codifica para proteína vWF recombinante; y b) expresar la proteína vWF en las células en condiciones de cultivo celular que comprenden un medio de cultivo celular que comprende una concentración de cobre de al menos 2,4 $\mu\text{g/l}$ y un sobrenadante de cultivo celular que comprende una concentración
- 40 de amonio de menos de 4 mM, en el que la proteína vWF es proteína vWF altamente multimérica y comprende una actividad de ristocetina específica de al menos aproximadamente 30 mU/ μg .

- En una realización específica de las composiciones de rvWF descritas anteriormente, la proteína vWF recombinante tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica de al menos aproximadamente 50 mU/ μg .
- 45

En una realización específica de las composiciones de rvWF descritas anteriormente, la proteína vWF recombinante tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica de desde aproximadamente 30 mU/ μg hasta aproximadamente 100 mU/ μg .

- 50 En una realización específica de las composiciones de rvWF descritas anteriormente, la proteína vWF recombinante comprende de aproximadamente 14 a aproximadamente 22 dímeros.

- En un aspecto, la presente invención proporciona una disolución de cultivo celular para producir proteína vWF recombinante, de alto peso molecular, comprendiendo la disolución de cultivo celular: un medio de cultivo celular que comprende una concentración de cobre de al menos aproximadamente 2,4 $\mu\text{g/l}$; un sobrenadante de cultivo celular que comprende una concentración de amonio de menos de 4 mM; y una pluralidad de células que expresan proteína vWF altamente multimérica, en la que la proteína vWF comprende de aproximadamente 14 a
- 55 aproximadamente 22 dímeros y una actividad de ristocetina específica de al menos aproximadamente 30 mU/ μg .

- 60 En un aspecto, la presente invención se refiere a condiciones de cultivo celular para producir vWF recombinante de alto peso molecular que está en forma altamente multimérica con una alta actividad específica. Las condiciones de cultivo celular usadas en la presente invención pueden incluir, por ejemplo, un medio de cultivo celular con una concentración de cobre aumentada y sobrenadante de cultivo celular con una concentración de amonio baja (NH_4^+). La presente divulgación también proporciona métodos para cultivar células en condiciones de cultivo celular para
- 65 expresar un vWF de alto peso molecular con una alta actividad específica.

En un aspecto, la presente invención incluye una disolución de cultivo celular para producir vWF recombinante, de alto peso molecular, que comprende un medio de cultivo celular que comprende una concentración de cobre de al menos 2,4 µg/l; un sobrenadante de cultivo celular que comprende una concentración de amonio de menos de 4 mM; y una pluralidad de células que expresan vWF altamente multimérico que comprende de aproximadamente 14 a aproximadamente 22 dímeros y una actividad de ristocetina específica de al menos aproximadamente 30 mU/µg. En una realización de las disoluciones de cultivo celular descritas anteriormente, al menos el 10 % del rvWF está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En una realización específica, al menos el 15 % del rvWF está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra realización específica, al menos el 20 % del rvWF está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra realización específica, al menos el 25 % del rvWF está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra realización específica, al menos el 30 % del rvWF está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En determinadas realizaciones, la concentración de cobre puede ser de al menos aproximadamente 4 µg/l o la concentración de cobre puede oscilar desde aproximadamente 2,4 µg/l hasta aproximadamente 20 µg/l. En algunas realizaciones, los medios de cultivo celular comprenden un complemento de medio que comprende cobre. En determinadas realizaciones, el complemento de medio puede comprender un hidrolizado o una sal de cobre, quelato de cobre, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la sal de cobre puede incluir sulfato de cobre, acetato de cobre, carbonato de cobre, cloruro de cobre, hidróxido de cobre, nitrato de cobre u óxido de cobre. En determinadas realizaciones, las células pueden proceder de una línea celular continua y pueden incluir células de mamífero, tales como células CHO. En algunas realizaciones, el vWF recombinante tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica de al menos aproximadamente 50 mU/µg, o la actividad de cofactor de ristocetina específica puede oscilar desde aproximadamente 30 mU/µg hasta aproximadamente 100 mU/µg.

En otro aspecto, la presente divulgación incluye un método de producción de un vWF recombinante, de alto peso molecular, que comprende a) proporcionar un cultivo de células; b) introducir una secuencia de ácido nucleico que codifica para vWF; c) seleccionar las células que portan la secuencia de ácido nucleico; y, d) expresar vWF en las células en condiciones de cultivo celular que comprenden un medio de cultivo celular que comprende una concentración de cobre de al menos 2,4 µg/l y un sobrenadante de cultivo celular que comprende una concentración de amonio de menos de aproximadamente 4 mM, en el que el vWF es vWF altamente multimérico que comprende de aproximadamente 14 a aproximadamente 22 dímeros y una actividad de ristocetina específica de al menos aproximadamente 30 mU/µg. En una realización del sobrenadante de cultivo celular descrito anteriormente, al menos el 10 % del rvWF está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En una realización específica, al menos el 15 % del rvWF está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra realización específica, al menos el 20 % del rvWF está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra realización específica, al menos el 25 % del rvWF está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra realización específica, al menos el 30 % del rvWF está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En algunas realizaciones, las células pueden proceder de una línea celular continua y pueden incluir células de mamífero, tales como células CHO. En determinadas realizaciones, la concentración de cobre puede ser de al menos aproximadamente 4 µg/l o la concentración de cobre puede oscilar desde 2,4 µg/l hasta 20 µg/l. En algunas realizaciones, los medios de cultivo celular comprenden un complemento de medio que comprende cobre. En determinadas realizaciones, el complemento de medio puede comprender un hidrolizado o una sal de cobre, quelato de cobre, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la sal de cobre puede incluir sulfato de cobre, acetato de cobre, carbonato de cobre, cloruro de cobre, hidróxido de cobre, nitrato de cobre u óxido de cobre. En algunas realizaciones, el vWF recombinante tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica de al menos aproximadamente 50 mU/µg, o la actividad de cofactor de ristocetina específica puede oscilar entre aproximadamente 30 mU/µg y aproximadamente 100 mU/µg.

Aún en otro aspecto, la presente divulgación incluye un vWF recombinante, de alto peso molecular producido mediante un procedimiento, que comprende las etapas de: a) proporcionar un cultivo de células; b) introducir una secuencia de ácido nucleico que codifica para vWF; c) seleccionar las células que portan la secuencia de ácido nucleico; y, d) expresar vWF en las células en condiciones de cultivo celular que comprenden un medio de cultivo celular que comprende una concentración de cobre de al menos 2,4 µg/l y un sobrenadante de cultivo celular que comprende una concentración de amonio de menos de 4 mM, en el que el vWF es vWF altamente multimérico que comprende de aproximadamente 14 a aproximadamente 22 dímeros y una actividad de ristocetina específica de al menos aproximadamente 30 mU/µg. En una realización del sobrenadante de cultivo celular descrito anteriormente, al menos el 10 % del rvWF está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En una realización específica, al menos el 15 % del rvWF está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra realización específica, al menos el 20 % del rvWF está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra realización específica, al menos el 25 % del rvWF está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra realización específica, al menos el 30 % del rvWF está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En algunas realizaciones, las células pueden proceder de una línea celular continua y pueden incluir células de mamífero, tales como células CHO. En determinadas realizaciones, la concentración de cobre puede ser de al

menos aproximadamente 4 µg/l o la concentración de cobre puede oscilar desde aproximadamente 2,4 µg/l hasta aproximadamente 20 µg/l. En algunas realizaciones, los medios de cultivo celular comprenden un complemento de medio que comprende cobre. En determinadas realizaciones, el complemento de medio puede comprender un hidrolizado o una sal de cobre, quelato de cobre, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la sal de cobre puede incluir sulfato de cobre, acetato de cobre, carbonato de cobre, cloruro de cobre, hidróxido de cobre, nitrato de cobre u óxido de cobre. En algunas realizaciones, el vWF recombinante tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica de al menos aproximadamente 50 mU/µg, o la actividad de cofactor de ristocetina específica puede oscilar desde aproximadamente 30 mU/µg hasta aproximadamente 100 mU/µg.

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende factor de von Willebrand recombinante (rvWF) que tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica de al menos 80 mU/µg.

En una realización de las composiciones descritas anteriormente, al menos el 10 % del rvWF en la composición está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En una realización específica, al menos el 15 % del rvWF está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra realización específica, al menos el 20 % del rvWF está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra realización específica, al menos el 25 % del rvWF está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra realización específica, al menos el 30 % del rvWF está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros.

En una realización de las composiciones descritas anteriormente, la composición comprende un sobrenadante de cultivo. En una realización específica, el sobrenadante de cultivo es un sobrenadante de cultivo celular de mamífero. En una realización más específica, el sobrenadante de cultivo celular de mamífero es un sobrenadante de células CHO.

En una realización de las composiciones descritas anteriormente, el rvWF se expresa en un cultivo celular que comprende al menos cobre 2,4 µg/l. En una realización específica, el cultivo celular comprende al menos cobre 4 µg/l. En una realización más específica, el cultivo comprende cobre entre 2,4 µg/l y 20 µg/l. En una realización, el cobre se proporciona como una sal de cobre, un quelato de cobre, o una combinación de los mismos. En una realización específica, la sal de cobre se selecciona del grupo que consiste en sulfato de cobre, acetato de cobre, carbonato de cobre, cloruro de cobre, hidróxido de cobre, nitrato de cobre y óxido de cobre.

En una realización de las composiciones descritas anteriormente, el cultivo celular es un cultivo discontinuo.

En una realización de las composiciones descritas anteriormente, el cultivo celular es un cultivo continuo. En una realización específica, el cultivo continuo se realiza en modo quimiostático. En otra realización específica, el cultivo continuo se realiza en modo de perfusión.

En una realización de las composiciones descritas anteriormente, el nivel de NH_4^+ en el cultivo se mantiene a una concentración por debajo de 4 mM.

En una realización de las composiciones descritas anteriormente, la densidad celular del cultivo se mantiene a menos de $2,5 \times 10^6$ células por ml.

En una realización de las composiciones descritas anteriormente, la densidad celular del cultivo se mantiene a menos de $2,0 \times 10^6$ células por ml.

En una realización de las composiciones descritas anteriormente, el cultivo se mantiene a menos de $1,5 \times 10^6$ células por ml.

En una realización de las composiciones descritas anteriormente, el rvWF se coexpresa con factor VIII recombinante (rFVIII). En una realización específica, se ha retirado la mayoría del rFVIII coexpresado. En una realización más específica, la razón de rvWF con respecto a rFVIII en la composición es de al menos 10:1.

En una realización de las composiciones descritas anteriormente, la composición se formula para la administración farmacéutica. En una realización específica, la composición se formula para administración intravenosa, subcutánea o intramuscular.

En una realización de las composiciones descritas anteriormente, la composición se liofiliza.

Aún en otro aspecto, la presente divulgación incluye un vWF recombinante, de alto peso molecular producido mediante un procedimiento, que comprende las etapas de: a) proporcionar un cultivo de células; b) introducir una secuencia de ácido nucleico que codifica para vWF; c) seleccionar las células que portan la secuencia de ácido nucleico; y, d) expresar vWF en las células en condiciones de cultivo celular que comprenden un medio de cultivo celular que comprende una concentración de cobre de al menos 2,4 µg/l y un sobrenadante de cultivo celular que

comprende una concentración de amonio de menos de 4 mM, en el que el vWF es vWF altamente multimérico que comprende de aproximadamente 14 a aproximadamente 22 dímeros y una actividad de ristocetina específica de al menos aproximadamente 30 mU/μg. Se entiende que todas las realizaciones y concentraciones descritas en las secciones de "Medios de cultivo celular" y "Métodos de producción de vWF recombinante" anteriores pueden aplicarse en este caso.

El vWF recombinante en la presente invención puede incluir una proteína vWF recombinante de alto peso molecular que tiene una alta actividad específica. En una realización, el vWF en la presente invención es una forma altamente multimérica de vWF. En algunas realizaciones, la forma altamente multimérica de vWF incluye al menos hasta aproximadamente 14 dímeros y en otras realizaciones al menos hasta aproximadamente 22 dímeros. Aún en otras realizaciones, la forma altamente multimérica de vWF puede oscilar desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 20 dímeros, o desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 25 dímeros, o desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 40 dímeros. En determinadas realizaciones, el vWF recombinante es comparable a vWF plasmático.

Tal como se describe en el presente documento, la presente invención proporciona el resultado sorprendente de que la concentración de cobre aumentada en medios de cultivo celular puede producir vWF de alto peso molecular con alta actividad específica. Los medios de cultivo celular que comprenden una concentración de cobre mayor de aproximadamente 2,4 μg/l pueden aumentar el rendimiento del vWF multimérico recombinante, en comparación con medios sin cobre. En determinadas realizaciones, el porcentaje de vWF multimérico (es decir, rvWF que comprende al menos 2 dímeros) puede ser mayor de aproximadamente el 50 %, o mayor de aproximadamente el 75 %, o mayor de aproximadamente el 90 %. La distribución multimérica del vWF puede analizarse usando técnicas convencionales tales como, por ejemplo, en electroforesis en agarosa en condiciones no reductoras.

Tal como se proporciona en el presente documento, el vWF recombinante producido mediante los métodos de la presente divulgación puede tener una alta actividad específica, por ejemplo, una alta actividad de cofactor de ristocetina específica. En una realización, el vWF recombinante producido mediante los métodos de la presente divulgación puede incluir una actividad de cofactor de ristocetina específica de al menos 30 mU/μg y en otra realización de al menos 50 mU/μg. En otras realizaciones, la actividad de cofactor de ristocetina específica puede oscilar desde aproximadamente 30 mU/μg hasta aproximadamente 100 mU/μg o desde aproximadamente 50 mU/μg hasta aproximadamente 100 mU/μg.

B. ADAMTS13 recombinante (rA13)

Las proteínas ADAMTS (es decir, de ADAMTS-1 a ADAMTS-20) son una familia de cinc-metaloproteinasas secretadas que comparten una organización de dominios modulares común (para revisión, véase, Flannery C.R., *Front Biosci.* 1 de enero de 2006;11:544-69). Todas las proteínas ADAMTS comparten una arquitectura de dominio central común que consiste en un péptido señal, seguido por un prodominio, un dominio catalítico de metaloproteinasa dependiente de cinc, un dominio similar a desintegrina, una repetición de trombospodina de tipo I, un dominio rico en cisteína y un dominio espaciador (Apte S.S., *J Biol Chem.* 13 de noviembre de 2009;284(46):31493-7). Adicionalmente, todas excepto ADAMTS-4 contienen al menos un dominio más de repetición de trombospodina de tipo I, y muchas de las proteínas ADAMTS contienen uno o más dominios auxiliares complementarios. De manera notable, se ha notificado que todas las proteínas ADAMTS parecen contener al menos un sitio de unión a calcio y al menos un sitio de unión a cinc ubicados dentro del dominio catalítico de metaloproteinasa (Andreini *et al.*, *J. Proteome Res.*, 2005, 4 (3), págs. 881-888).

Se han notificado los papeles biológicos para las proteínas ADAMTS para diversas enfermedades y estados, incluyendo, angiogénesis, fibrosis intersticial renal, remodelación ósea, foliculogénesis de ovario, aterosclerosis, desarrollo genitourinario y crecimiento/remodelación tumoral (ADAMTS-1); síndrome de Ehler-Danlos de tipo 7C y dermatoparaxis bovina (ADAMTS-2); artritis, aterosclerosis y tendinopatía (ADAMTS-4); artritis y glioblastoma (ADAMTS-5); artritis (ADAMTS-7); angiogénesis, tumores malignos cerebrales, artritis y aterosclerosis (ADAMTS-8); artritis (ADAMTS-9, -12); púrpura trombótica trombocitopénica (ADAMTS-13); y antitrombosis/accidente cerebrovascular (ADAMTS18) (para revisión, véase, Lin y Liu, *Open Access Rheumatology Research and Reviews* 2009:1 121-131).

ADAMTS13 (A13) recombinante se ha expresado antes en células de mamífero, sin embargo, la actividad específica varía ampliamente dependiendo de las condiciones de cultivo celular. Se ha encontrado que muchos medios de cultivo disponibles comercialmente no son suficientes para la expresión de A13 con altas actividades específicas, expresadas como la razón de actividad, medida mediante el ensayo de FRETs-VWF73, con respecto al contenido de antígenos, tal como se determina mediante ELISA. En un aspecto, los métodos proporcionados en el presente documento se basan en varios hallazgos ventajosos que permiten la expresión de cultivo celular de rA13 que tiene niveles aumentados de actividad total y específica.

Por consiguiente, debido a la relación estructura-función compartida entre la familia ADAMTS de metaloproteinasas secretadas, los métodos proporcionados por la presente divulgación permiten la expresión de todas las proteínas

ADAMTS en cultivo celular y la recuperación del medio celular.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende ADAMTS 13 recombinante (rA13) que tiene una actividad mediante FRETs-vWF específica de al menos 1600 mU/ μ g.

5 En una realización de las composiciones descritas anteriormente, el rA13 tiene una actividad mediante FRETs-vWF específica de al menos 800 mU/ μ g.

10 En una realización de las composiciones descritas anteriormente, la composición comprende un sobrenadante de cultivo. En una realización específica, el sobrenadante de cultivo es un sobrenadante de cultivo celular de mamífero. En una realización más específica, el sobrenadante de cultivo celular de mamífero es un sobrenadante de células CHO.

15 En una realización de las composiciones descritas anteriormente, el rA13 se expresa en un cultivo celular que comprende al menos cobre 1 μ g/l. En una realización específica, el cultivo celular comprende al menos cobre 2 μ g/l. En una realización más específica, el cultivo comprende cobre entre 2 μ g/l y 20 μ g/l.

20 En una realización de las composiciones descritas anteriormente, el cobre se proporciona como una sal de cobre, un quelato de cobre, o una combinación de los mismos. En una realización específica, la sal de cobre se selecciona del grupo que consiste en sulfato de cobre, acetato de cobre, carbonato de cobre, cloruro de cobre, hidróxido de cobre, nitrato de cobre y óxido de cobre.

En una realización de las composiciones descritas anteriormente, el cultivo celular es un cultivo discontinuo.

25 En una realización de las composiciones descritas anteriormente, el cultivo celular es un cultivo continuo. En una realización específica, el cultivo continuo se realiza en modo quimiostático. En otra realización específica, el cultivo se realiza en modo de perfusión.

30 En una realización de las composiciones descritas anteriormente, el nivel de NH_4^+ en el cultivo se mantiene a una concentración por debajo de 5 mM.

En una realización de las composiciones descritas anteriormente, el nivel de NH_4^+ en el cultivo se mantiene a una concentración por debajo de 4 mM.

35 En una realización de las composiciones descritas anteriormente, la densidad celular del cultivo se mantiene a menos de $4,0 \times 10^6$ células por ml. En una realización específica, la densidad celular del cultivo se mantiene a menos de $3,0 \times 10^6$ células por ml. En una realización específica, la densidad celular del cultivo se mantiene a menos de $2,0 \times 10^6$ células por ml. En una realización más específica, la densidad celular del cultivo se mantiene a menos de $1,5 \times 10^6$ células por ml.

40 En una realización de las composiciones descritas anteriormente, la composición se formula para administración farmacéutica. En una realización específica, la composición se formula para administración intravenosa, subcutánea o intramuscular.

45 En una realización de las composiciones descritas anteriormente, la composición se liofiliza.

VI. Formulaciones

50 En un aspecto, las formulaciones que comprenden las proteínas terapéuticas recombinantes rvWF o rA13 de la presente divulgación se liofilizan antes de la administración. La liofilización se lleva a cabo usando técnicas comunes en la técnica y debe optimizarse para la composición que está desarrollándose [Tang *et al.*, Pharm Res. 21:191-200, (2004) y Chang *et al.*, Pharm Res. 13:243-9 (1996)].

55 Los métodos de preparación de formulaciones farmacéuticas pueden incluir una o más de las siguientes etapas: añadir un agente de estabilización tal como se describe en el presente documento a dicha mezcla antes de liofilizar, añadir al menos un agente seleccionado de un agente de carga, un agente de regulación de la osmolaridad y un tensioactivo, cada uno de los cuales es tal como se describe en el presente documento, a dicha mezcla antes de la liofilización. En un aspecto, una formulación liofilizada está compuesta por uno o más de un tampón, un agente de carga y un estabilizador. En este aspecto, la utilidad de un tensioactivo se evalúa y se selecciona en casos en los que la agregación durante la etapa de liofilización o durante la reconstitución se convierte en un problema. Se incluye un agente tamponante apropiado para mantener la formulación dentro de zonas estables de pH durante la liofilización.

65 La práctica de reconstitución convencional para material liofilizado es añadir de nuevo un volumen de agua pura o agua estéril para inyección (WFI) (normalmente equivalente al volumen retirado durante la liofilización), aunque en ocasiones se usan disoluciones diluidas de agentes antibacterianos en la producción de productos farmacéuticos

para la administración parenteral [Chen, Drug Development and Industrial Pharmacy, 18:1311-1354 (1992)]. Por consiguiente, se proporcionan métodos para la preparación de composiciones de vWF recombinante reconstituidas que comprenden la etapa de añadir un diluyente a una composición de vWF recombinante liofilizada de la invención.

El material liofilizado puede reconstituirse como una disolución acuosa. Una variedad de portadores acuosos, por ejemplo, agua estéril para inyección, agua con conservantes para el uso en dosis múltiples, o agua con cantidades apropiadas de tensioactivos (por ejemplo, una suspensión acuosa que contiene el principio activo en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas). En diversos aspectos, tales excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo y sin limitación, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábica; agentes dispersantes o humectantes que son un fosfátido que se produce manera natural, por ejemplo y sin limitación, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos, por ejemplo y sin limitación, estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo y sin limitación, heptadecaetil-eneoxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietilensorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo y sin limitación monooleato de polietilensorbitano. En diversos aspectos, las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo y sin limitación, etilo, o n-propilo, p-hidroxibenzoato.

Para administrar las composiciones a humanos o animales de prueba, en un aspecto, las composiciones comprenden uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Las expresiones "farmacéuticamente" o "farmacológicamente" aceptable se refieren a entidades moleculares y composiciones que son estables, inhiben la degradación de proteínas tal como productos de agregación y escisión, y además no producen reacciones alérgicas u otras reacciones adversas cuando se administran usando vías bien conocidas en la técnica, tal como se describe a continuación. Los "portadores farmacéuticamente aceptables" incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción y similares, clínicamente útiles, incluyendo los agentes divulgados anteriormente.

Las formulaciones farmacéuticas se administran por vía intravenosa, oral, tópica, transdérmica, parenteral, mediante pulverización por inhalación, vaginal, rectal o mediante inyección intracraneal. El término parenteral tal como se usa en el presente documento incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intracisternal, o técnicas de infusión. También se contempla la administración mediante inyección intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar y/o implantación quirúrgica en un sitio particular. Generalmente, las composiciones están esencialmente libres de pirógenos, así como de otras impurezas que podrían ser perjudiciales para el receptor.

Las administraciones individuales o múltiples de las composiciones se llevan a cabo con niveles de dosis y regímenes que se seleccionan por el médico que atiende. Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada depende del tipo de enfermedad que va a tratarse, de la gravedad y del transcurso de la enfermedad, de si el fármaco se administra por propósitos preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, de la historia clínica del paciente y de la respuesta al fármaco, y de la opinión del médico especialista.

En un aspecto, las formulaciones de la divulgación se administran mediante un bolo inicial seguido por una infusión continua para mantener niveles circulantes terapéuticos del producto farmacológico. Como otro ejemplo, el compuesto inventivo se administra como una dosis única. Los expertos habituales en la técnica optimizarán fácilmente las dosificaciones eficaces y los regímenes de administración tal como se determina por la buena práctica médica y el estado clínico del paciente individual. La frecuencia de la dosificación depende de los parámetros farmacocinéticos de los agentes y de la vía de administración. La formulación farmacéutica óptima la determina un experto en la técnica dependiendo de la vía de administración y de la dosificación deseada. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042) páginas 1435-1712. Tales formulaciones influyen en el estado físico, la estabilidad, la tasa de liberación *in vivo*, y la tasa de aclaramiento *in vivo* de los agentes administrados. Dependiendo de la vía de administración, se calcula una dosis adecuada según el peso corporal, el área de superficie corporal y el tamaño del órgano. Las dosificaciones apropiadas pueden determinarse a través del uso de ensayos establecidos para determinar dosificaciones en concentración sanguínea conjuntamente con datos de dosis-respuesta apropiados. El régimen de dosificación final lo determina el médico especialista, considerando diversos factores que modifican la acción de los fármacos, por ejemplo, la actividad específica del fármaco, la gravedad del daño y la capacidad de respuesta del paciente, la edad, el estado, el peso corporal, el sexo y la dieta del paciente, la gravedad de cualquier infección, el tiempo de administración y otros factores clínicos. A modo de ejemplo, una dosis típica de un vWF recombinante de la presente invención es de aproximadamente 50 U/kg, igual a 500 µg/kg. A medida que se realicen estudios, surgirá más información con respecto a los niveles de dosificación apropiados y la duración del tratamiento para diversas enfermedades y estados.

VII. Métodos de tratamiento

La presente divulgación contempla además métodos de tratamiento de un paciente que necesita rVWF o rA13 producidos según los métodos descritos en el presente documento. Tales métodos de tratamiento pueden incluir la administración de formulaciones farmacéuticas que comprenden la rA13 recombinante o el vWF recombinante, de alto peso molecular de la presente divulgación.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para tratamientos terapéuticos o profilácticos que comprenden la administración de una composición de rvWF o rA13 proporcionada en el presente documento. Generalmente, para aplicaciones terapéuticas, las formulaciones se administran a un sujeto con una enfermedad o estado asociado con una disfunción de ADAMTS 13 o vWF o que en cualquier caso necesita los mismos, en una "dosis terapéuticamente eficaz." Las formulaciones y las cantidades eficaces para sus usos dependerán de la gravedad de la enfermedad o estado y del estado general de salud del paciente. Las administraciones individuales o múltiples de las formulaciones pueden administrarse dependiendo de la dosificación y la frecuencia requeridas y toleradas por el paciente.

En una realización, la presente divulgación proporciona métodos de tratamiento o prevención de una enfermedad o estado asociado con una disfunción de ADAMTS13 o vWF. En una realización adicional, las formulaciones farmacéuticas que comprenden vWF recombinante pueden administrarse para tratar enfermedades relacionadas con vWF, tal como la enfermedad de von Willebrand o la hemofilia. En otra realización, la divulgación proporciona métodos de tratamiento o prevención de una enfermedad o estado asociado con la formación y/o la presencia de uno o más trombos, que comprende la administración de una composición de rA13 proporcionada en el presente documento. En otra realización, la divulgación proporciona métodos de disgregar uno o más trombos en un sujeto que lo necesita. Aún en otras realizaciones, la divulgación proporciona métodos de tratamiento o prevención de un infarto en un sujeto que lo necesita. Generalmente, los métodos proporcionados por la divulgación comprenden administrar una composición de rADAMTS13 tal como se proporciona en el presente documento a un sujeto que lo necesita.

Los ejemplos no limitativos de trastornos asociados con la formación y/o la presencia de uno o más trombos son púrpura trombocitopéptica trombótica (TTP) hereditaria, TTP adquirida, trombosis arterial, infarto de miocardio agudo (AMI), accidente cerebrovascular, septicemia y coagulación intravascular diseminada (DIC).

Los ejemplos no limitativos de trastornos asociados con un infarto, incluyen sin limitación, infarto de miocardio (ataque cardíaco), embolia pulmonar, acontecimientos cerebrovasculares tales como accidente cerebrovascular, enfermedad oclusiva arterial periférica (tal como gangrena), síndrome antifosfolípido, septicemia, arteritis de células gigantes (GCA), hernia y vólvulo.

VIII. Ejemplos

Ahora se ilustrará adicionalmente la presente invención en los siguientes ejemplos, sin limitarse a los mismos.

Ejemplo 1

Se realizaron experimentos de cultivo celular continuo usando cultivos de una línea celular CHO recombinante que expresaba vWF. El medio basal era DMEM/F12, que contenía aproximadamente 0,3 µg/l de Cu²⁺. Se complementó el medio con hidrolizado de soja y sulfato de cobre (CuSO₄·5H₂O) para llevar la concentración de cobre final en el medio a más de al menos 2,4 µg/l.

Se cultivaron células CHO recombinantes que expresaban vWF mediante cultivos celulares continuos de modo que los niveles de amonio (NH₄⁺) se mantuvieron a una concentración de menos de aproximadamente 10 mM. Se encontró que los sistemas de producción que proporcionaban un suministro continuo de medio (por ejemplo, cultivos por perfusión o quimiostato) eran preferibles porque las técnicas convencionales discontinuas o semicontinuas producían concentraciones altas de NH₄⁺ al final del cultivo. Al final del cultivo, se aisló el vWF altamente multimérico y se midió la actividad de cofactor de ristocetina específico del vWF.

Ejemplo 2

Se coexpresaron factor VIII recombinante (rFVIII) y factor de von Willebrand (rvWF) en cultivos discontinuos de células GD8/6 para determinar el efecto de la composición del medio de cultivo sobre la expresión y actividad de vWF. En resumen, se sometieron células GD8/6 a cultivo discontinuo en medio BAV-SP compuesto por un polvo basal de DMEM/F12 modificado (tabla 5) y complementos adicionales que también contenían 4 g/l de hidrolizado de soja, véase la tabla 6, con y sin complementación con cobre adicional. Para someter a prueba el efecto de concentraciones bajas de cobre sobre la expresión y actividad de rvWF, se usaron medios BAV-SP basales. Los medios basales contenían 0,3 µg/l de cobre y se complementaron con hidrolizado de soja, lo que contribuyó 0,7 µg/l adicionales de cobre, tal como se determinó experimentalmente, proporcionando una concentración de cobre final de 1,0 µg/l. En comparación, los medios BAV-SP usados para los cultivos discontinuos se complementaron adicionalmente con 3,3 µg/l adicionales de Cu²⁺, proporcionando una concentración de cobre final de 4,3 µg/l, para

determinar el efecto de concentraciones altas de cobre sobre la expresión y actividad de vWF.

Tabla 5. Composición de medios de cultivo BAV-SP

Medio BAV-SP	
Componentes	mg/l
Aminoácidos	
L-Alanina	4,45
L-Arginina HCl	147,50
L-Asparagina-H ₂ O	30,21
L-Ácido aspártico	6,65
L-Cisteína HCl-H ₂ O	32,55
L-Cistina 2HCl	57,35
L-Ácido glutámico	7,35
Glicina	18,75
L-Histidina-H ₂ O HCl	31,48
Hidroxi-L-Prolina	
L-Isoleucina	54,47
L-Leucina	59,05
L-Lisina HCl	91,25
L-Metionina	17,24
L-Fenilalanina	35,48
L-Prolina	52,24
L-Serina	26,25
L-Treonina	53,45
L-Triptófano	29,01
L-Tirosina 2Na 2H ₂ O	55,79
L-Valina	52,85
Vitaminas	
Ácido ascórbico	3,499
Biotina	0,0035
Cloruro de colina	8,980
D-Pantotenato de Ca	2,240
Ácido fólico	2,650
L-Inositol	12,600
Nicotinamida	2,020
Piridoxina HCl	2,031
Riboflavina	0,219
Tiamina HCl	2,170
Vitamina B12	0,680
Sales inorgánicas	
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	116,600
Sulfato de cobre (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0,0013
Nitrato férrico (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	0,050
Sulfato ferroso (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	0,417
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	28,640
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	48,840
Cloruro de potasio (KCl)	311,800
Cloruro de sodio (NaCl)	6995,500
Fosfato de sodio (Na ₂ HPO ₄)	71,020
Fosfato de sodio (NaH ₂ PO ₄)	62,500
Sulfato de cinc heptahidratado (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	0,432
Selenito de sodio	0,0131
Otros	
D-Glucosa	3151
Ácido linoleico	0,042
Ácido lipoico	0,105
Putrescina 2HCl	0,081
Timidina	0,365
Hipoxantina Na	2,390
Piruvato de sodio	55,000

Tabla 6. Composición de complemento de BAV-SP

Componentes para formulación final	
L-Glutamina	600,00
Etanolamina	1,530
Synperonic F68	250,000
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	2000,000
Peptona de soja	4000,00
Formulación total	18596,8

Se hicieron crecer células GD8/6 que expresaban rVWF o bien en medios con bajo contenido en cobre (tabla 7) o medios con alto contenido en cobre (tabla 8) durante 7 días. Tras 2 días se subcultivaron los cultivos para realizar un cultivo discontinuo durante un periodo de 5 días. Se sometieron a prueba diariamente muestras del sobrenadante de cultivo para determinar el contenido en rVWF (ELISA de vWF), total (ristocetina) y específico (actividad específica) mediante un ensayo de cofactor de ristocetina. También se monitorizaron diariamente diversos parámetros de cultivo, incluyendo recuento celular, viabilidad celular y concentración de amonio (excepto por los días 3 y 4 de lote).

De manera inesperada, cultivos celulares que se hicieron crecer con concentraciones altas de cobre produjeron sobrenadantes que contenían significativamente más actividad de rVWF total y específica (compárense los resultados de la tabla 7 y la tabla 8). Por ejemplo, en el día 4 de lote, el cultivo celular que se hizo crecer con una concentración alta de cobre contenía 1,52 UI de actividad de rVWF/ml, en comparación con 0,2 UI de actividad de rVWF/ml para el cultivo con bajo contenido en cobre. Esto era así a pesar del hecho de que el cultivo celular con bajo contenido en cobre produjo casi el doble de la cantidad de rVWF que el cultivo celular con alto contenido en cobre. Además, la actividad específica del sobrenadante obtenido a partir del cultivo con alto contenido en cobre era más de 13 veces superior a la del sobrenadante de cultivo con bajo contenido en cobre (831 mU/10 µg de rVWF frente a 62 mU/10 µg de rVWF).

Tal como se observa en la tabla 7 y la tabla 8, la actividad de cofactor de ristocetina específico y total del cultivo con alto contenido en cobre era el doble de la del cultivo con bajo contenido en cobre en el día 1 de lote. Además, a diferencia de los aumentos posteriores de la actividad observados en el cultivo con alto contenido en cobre, no se observó ningún aumento en la cantidad de actividad de cofactor de ristocetina tras el día 1 de lote para el cultivo celular con bajo contenido en cobre. De manera que concuerda con este resultado, el análisis por electroforesis en gel de agarosa del estado multimérico de rVWF reveló que estaba presente una concentración baja de rVWF de alto peso molecular, con respecto a la concentración de especies de rVWF de bajo peso molecular, en el sobrenadante del cultivo celular con bajo contenido en cobre en el día 1 de lote, y que la concentración relativa disminuyó adicionalmente a lo largo del tiempo (figura 1A y 1B). En cambio, la complementación del medio de cultivo con Cu²⁺ dio como resultado una formación sistemática de antígeno activo de cofactor de ristocetina (RiCoF) a lo largo del cuarto día. Sistemáticamente, no se produjo ninguna pérdida en la cantidad de multímeros de rVWF de alto peso molecular estables a lo largo del día 4 del cultivo discontinuo (figura 1A y 1B). Los resultados densitométricos del gel de electroforesis de agarosa mostrados en la figura 1B revelaron que en condiciones de bajo contenido en cobre el cultivo sólo podía producir una población de rVWF en la que más del 10 % (es decir, el 16,3 %) del rVWF estaba presente en moléculas que tenían más de 10 dímeros durante un día del cultivo discontinuo (es decir muestra de "día 3" en el carril 2 del gel de agarosa de la figura 1A), y de manera notable, esta población disminuyó hasta tan sólo el 4 % en el día 5 del cultivo discontinuo (muestra de "día 7" en el carril 6). En cambio, en condiciones de alto contenido en cobre la cantidad relativa de multímeros de vWF con más de 10 dímeros es sistemáticamente de aproximadamente el 30 % a lo largo del día 4 del cultivo discontinuo (de "día 3" a "día 6" en los carriles 7-10; del 28 % al 31,4 %).

De manera notable, comenzando en el día 5 de lote del cultivo discontinuo con alto contenido en cobre, cuando los niveles de NH₄⁺ superaron 100 mg/l (más de aproximadamente 5,0 mM), la expresión de antígeno adicional (de 18,3 a 35,4 µg/l; compárense los días 4 y 5 de lote de la tabla 8) no dieron como resultado un aumento concomitante en la actividad de RiCoF presente en el sobrenadante. De manera que concuerda con este resultado, el nivel de multímeros de rVWF de alto peso molecular en el día 5 de lote (día 7 del cultivo) disminuyó con respecto a la concentración de multímeros de rVWF de bajo peso molecular. También sólo en el día 5 de lote (muestra de "día 7" del cultivo en el carril 11) la cantidad relativa del vWF con más de 10 dímeros se reduce hasta el 21,4 %.

Tomados en conjunto, los datos proporcionados anteriormente demuestran que la complementación de concentraciones de cobre en cultivos celulares que expresan rVWF aumenta drásticamente la actividad de cofactor de ristocetina rVWF total y específico, así como la producción estable de multímeros de rVWF de alto peso molecular. Además, los datos muestran una correlación entre la presencia de concentraciones altas de NH₄⁺ en el cultivo celular y la pérdida de actividad de cofactor de ristocetina rVWF y producción de multímeros de rVWF de alto peso molecular.

Tabla 7. Expresión de rVWF en cultivo celular de mamífero realizado en modo discontinuo usando medios BAV-SP con una concentración baja de cobre (1,0 µg/l).

día de lote	Recuento celular [10E6 células/ml]	NH ₄ ⁺ [mg/l]	Viabilidad [%]	ELISA de vWF [μg/ml]	Ristocetina [UI/ml]	Actividad específica, mU/10 μg
0	0,42	21	98,8	n.d.	n.d.	n.d.
1	0,78	43	n.d.	6,3	0,23	365
2	1,24	64	99,1	12,8	0,23	180
3	1,86	n.d.	n.d.	22,7	0,21	93
4	2,49	n.d.	n.d.	32,2	0,20	62
5	3,11	106	98,3	44,4	0,20	45

Tabla 8. Expresión de rVWF en cultivo celular de mamífero realizado en modo discontinuo usando medios BAV-SP con una concentración alta de cobre (4,3 μg/l).

día de lote	Recuento celular [10E6 células/ml]	NH ₄ ⁺ [mg/l]	Viabilidad [%]	ELISA de vWF [μg/ml]	Ristocetina [UI/ml]	Actividad específica, mU/10 μg
0	0,40	21	99,3	n.d.	n.d.	n.d.
1	0,71	42	n.d.	4,8	0,40	833
2	1,23	63	99,5	8,7	0,62	713
3	1,85	n.d.	n.d.	15,0	1,07	713
4	2,54	n.d.	n.d.	18,3	1,52	831
5	3,32	109	98,9	35,4	1,55	438

Ejemplo 3

Se coexpresaron factor VIII recombinante (rFVIII) y factor de von Willebrand (rVWF) en cultivos continuos de células GD8/6 realizados en condiciones quimiostáticas para determinar el efecto de la composición del medio de cultivo sobre la expresión y actividad de vWF. En resumen, se cultivaron células GD8/6 en medio BAV-SP que contenía 4 g/l de hidrolizado de soja con y sin complementación con cobre tal como se describió en el ejemplo 2. Para someter a prueba el efecto de concentraciones bajas de cobre sobre la expresión y actividad de rVWF, se usaron medios BAV-SP basales. Los medios basales contenían 0,3 μg/l de cobre y se complementaron con hidrolizado de soja, lo que contribuyó 0,7 μg/l adicionales de cobre, proporcionando una concentración de cobre final de 1,0 μg/l. Como comparación, se complementaron adicionalmente los medios BAV-SP usados para los cultivos discontinuos con 3,3 μg/l adicionales de Cu²⁺, proporcionando una concentración de cobre final de 4,3 μg/l, para determinar el efecto de concentraciones altas de cobre sobre la expresión y actividad de vWF. Se cultivaron cultivos que se hicieron crecer en presencia de concentraciones altas y bajas de cobre con densidades celulares tanto alta (2,8 × 10⁶ células/ml) como baja (aprox. 1,4 × 10⁶ células/ml).

Como anteriormente, se sometieron a prueba muestras del sobrenadante de cultivo para determinar el contenido en rVWF (ELISA de vWF), actividad total (ristocetina) y específica (actividad específica) mediante un ensayo de cofactor de ristocetina. También se monitorizaron diversos parámetros de cultivo, incluyendo recuento celular, viabilidad celular y concentración de amonio. Se generaron datos a partir de la fase en estado estacionario de las semanas 2 y 3 de los cultivos con quimiostato (de tabla 9 a tabla 13).

Tabla 9. Datos medios para la expresión de rVWF en cultivo celular quimiostático durante las semanas 2 y 3.

Recuento celular	Concentración de cobre	Recuento celular [10E6 células/ml]	NH ₄ ⁺ [mM]	Viabilidad [%]	ELISA de vWF [μg/ml]	Ristocetina [UI/ml]	actividad específica [mU/10 μg]
alto	baja	2,88	3,88	97,74	44,56	0,10	21,62
alto	alta	2,79	4,04	98,25	38,38	0,19	53,11
bajo	baja	1,55	3,33	98,63	18,96	0,10	50,16
bajo	alta	1,43	3,17	98,59	11,76	0,70	598,76

Tabla 10. Expresión de rVWF en cultivo celular quimiostático en condiciones de alto recuento celular, bajo contenido en cobre durante las semanas 2 y 3.

Día	Recuento celular [10E6 células/ml]	NH ₄ ⁺ [mM]	Viabilidad [%]	ELISA de vWF [mg/ml]	Ristocetina [UI/ml]	actividad específica [mU/10 μg]
8	2,54	3,7	98,20	39,8	0,095	23,86934673
9	3,02	4,2	97,40			
10	2,97	3,9	97,90	41,3	0,095	23,00242131

11	2,78					
13	2,91	3,8	97,60	41,7	0,095	22,78177458
14	2,90	3,8	97,40			
15	3,05	3,9	97,70	44,7	0,095	21,25279642
16	2,99	3,8	98,30			
17	2,76	3,9	97,40	55,3	0,095	17,17902351
	2,88	3,88	97,74	44,56	0,10	21,62

Tabla 11. Expresión de rVWF en cultivo celular quimiostático en condiciones de alto recuento celular, alto contenido en cobre durante las semanas 2 y 3.

Día	Recuento celular [10E6 células/ml]	NH ₄ ⁺ [mM]	Viabilidad [%]	ELISA de vWF [µg/ml]	Ristocetina [UI/ml]	actividad específica [mU/10 µg]
8	2,52	3,9	98,30	31,8	0,35	110,0628931
9	2,92	4,3	98,50			
10	2,80	4,2	98,60	37,4	0,32	85,56149733
11	2,57					
13	2,81	3,9	98,50	37,6	0,095	25,26595745
14	2,92	3,9	97,80			
15	2,77	3,9	97,80	43,0	0,095	22,09302326
16	2,72	4,0	98,30			
17	3,04	4,1	98,20	42,1	0,095	22,56532067
	2,79	4,04	98,25	38,38	0,19	53,11

5 Tabla 12. Expresión de rVWF en cultivo celular quimiostático en condiciones de bajo recuento celular, bajo contenido en cobre durante las semanas 2 y 3.

Día	Recuento celular [10E6 células/ml]	NH ₄ ⁺ [mM]	Viabilidad [%]	ELISA de vWF [µg/ml]	Ristocetina [UI/ml]	actividad específica [mU/10 µg]
8	1,61	3,3	99,10	19,3	0,095	49,22279793
9	1,65	3,3	98,00			
10	1,49	3,3	98,90	18,6	0,095	51,07526882
11	1,58					
13	1,58	3,4	98,10	18,1	0,095	52,48618785
14	1,56	3,3	99,30			
15	1,52	3,3	98,50	18,9	0,095	50,26455026
16	1,50	3,3	98,40			
17	1,50	3,4	98,70	19,9	0,095	47,73869347
	1,55	3,33	98,63	18,96	0,10	50,16

10 Tabla 13. Expresión de rVWF en cultivo celular quimiostático en condiciones de bajo recuento celular, alto contenido en cobre durante las semanas 2 y 3.

Día	Recuento celular [10E6 células/ml]	NH ₄ ⁺ [mM]	Viabilidad [%]	ELISA de vWF [µg/ml]	Ristocetina [UI/ml]	actividad específica [mU/10 µg]
8	1,46	3,2	98,80	11,6	0,73	629,3103448
9	1,45	3,2	98,20			
10	1,37	3,1	98,90	11,0	0,7	636,3636364
11	1,43					
13	1,33	3,2	98,10	11,1	0,68	612,6126126
14	1,39	3,2	97,20			
15	1,51	3,2	99,70	12,4	0,69	556,4516129
16	1,49	3,2	98,60			
17	1,43	3,2	99,20	12,7	0,71	559,0551181
	1,43	3,17	98,59	11,76	0,70	598,76

15 Tal como se muestra en la figura 2A, el sobrenadante recogido de cultivo celular de rVWF continuo que se hizo crecer a bajas densidades celulares y altas concentraciones de cobre contenía alta actividad específica (promedio de 600 mU/10 µg), mientras que el sobrenadante recogido de cultivos celulares de rVWF que se hicieron crecer a altas densidades celulares en presencia de concentraciones altas o bajas de cobre y cultivos celulares de rVWF que

se hicieron crecer a baja densidad celular en presencia de concentración baja de cobre contenían bajas actividades específicas (menos de 100 mU/10 µg). De manera que concuerda con los resultados observados para cultivos discontinuos, la figura 2B muestra que los cultivos celulares de mamífero continuos que expresan rvWF con altas actividades específicas tienen concentraciones de NH_4^+ menores que los cultivos que producen rvWF con bajas actividades específicas. Estos datos refuerzan adicionalmente la correlación entre la concentración de NH_4^+ en el cultivo celular y la actividad específica de rvWF producida por el cultivo. De manera notable, la combinación de concentración alta de cobre y concentración baja de amonio en el cultivo celular permitida para la producción mejoró significativamente la actividad de rvWF.

De manera que concuerda con este resultado, el análisis mediante electroforesis en gel de agarosa del estado multimérico de rvWF de cultivos con quimiostato (figura 6) reveló que sólo los sobrenadantes de cultivos realizados a alto contenido en cobre y baja densidad celular y por tanto bajo contenido en amonio dieron como resultado una expresión sistemática alta de vWF multimérico (aproximadamente del 23 % al 27 % en el día 8, 17 y 24 de CST en los carriles 4, 8 y 12, respectivamente). Ninguna de las demás condiciones alcanza sistemáticamente altas cantidades de más del 10 % de vWF con más de 10 dímeros a lo largo de un periodo de cultivo prolongado.

Ejemplo 4

Para determinar el efecto de la concentración de cobre en medios de cultivo sobre la expresión y actividad específica de rA13, se hicieron crecer cultivos celulares de mamífero que expresaban rA13 durante 4 semanas en condiciones de cultivo continuo quimiostático en medio ADAMTS 13 que comprendía medios basales DMEM/F12 modificados BESP845 y complementos adicionales (tabla 14) que contenían concentraciones de cobre que oscilaban entre 0,66 µg/l (sin complementación adicional de cobre) y con complementación adicional de cobre hasta 4 µg/l. Tal como se muestra en la tabla 15, aumentar la concentración de cobre en los medios de cultivo celular dio como resultado un aumento significativo de la productividad volumétrica (P) y específica (q) expresada como la actividad de rA13 total producida por litro de cultivo y día y la actividad de rA13 total producida por célula y día, respectivamente.

Tabla 14. Composición de medio ADAMTS13.

DMEM/F12 BESP845	
Aminoácidos	mg/l
L-Alanina	13,3500
L-Arginina HCl	147,5000
L-Asparagina-H ₂ O	45,1600
L-Ácido aspártico	19,9500
L-Cisteína HCl-H ₂ O	32,5500
L-Cistina 2HCl	102,3500
L-Ácido glutámico	22,0500
Glicina	26,2500
L-Histidina-H ₂ O HCl	51,4800
L-Isoleucina	74,4700
L-Leucina	119,0500
L-Lisina HCl	146,2500
L-Metionina	100,0000
L-Fenilalanina	60,4800
L-Prolina	63,7400
L-Serina	36,7500
L-Treonina	53,4500
L-Triptófano	29,0100
L-Tirosina 2Na 2H ₂ O	75,7900
L-Valina	82,8500
sales	mg/l
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	116,6000
Sulfato de cobre (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0,0026
Nitrato férrico (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	0,0500
Sulfato ferroso (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	1,0170
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	28,6400
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	48,8400
Cloruro de potasio (KCl)	311,8000
Cloruro de sodio (NaCl)	5495,5000
Na ₂ HPO ₄ anhidro	213,0200
NaH ₂ PO ₄ anhidro	54,3500
Sulfato de cinc heptahidratado (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	0,4320

27H ₂ O)	
Selenito de sodio anhidro	0,0087
Vitaminas	mg/l
Ácido ascórbico	3,4990
Biotina	0,2035
Cloruro de colina	26,9800
D-Pantotenato de Ca	6,2400
Ácido fólico	6,6500
L-Inositol	36,6000
Nicotinamida	7,0200
Piridoxina HCl	6,0310
Riboflavina	0,6590
Tiamina HCl	6,5100
Vitamina B12	2,6800
varios	mg/l
D-Glucosa	5000,0000
Ácido linoleico	0,0420
Ácido lipoico	1,0050
Putrescina 2HCl	3,6810
Timidina	0,3650
Hipoxantina Na	2,3900
Piruvato de sodio	55,0000
DMEM/F12 BESP845: Total	12738,3
Suplementos de medio ADAMTS-13	mg/l
L-Glutamina	1300,0000
Pluronic F68	1000,0000
Etanolamina	1,5300
ZnSO ₄ *7 H ₂ O	1,0000
Hidrogenocarbonato de Na	1500,0000
Total de complementos	3802,5
Cantidad total de componentes	16540,8

Para determinar si las concentraciones de cobre aumentadas afectaban a la integridad de la rA13 expresada, se examinó sobrenadante recogido de cultivos celulares de rA13 que se hicieron crecer en medios que contenían 0,66 µg/l, 1 µg/l y 4 µg/l de cobre mediante análisis de SDS-PAGE. Tal como se observa en la figura 3A (tinción con plata) y la figura 3B (inmunotransferencia de tipo Western anti-A13), no se observó ningún cambio evidente en la calidad de producto mediante electroforesis en gel. Específicamente, ningún aumento en el nivel de variantes de rA13 de 170 kD truncada u otras variantes de bajo PM y ninguna otra banda de HCP adicional o aumentada resultaron de la expresión de rA13 en presencia de concentraciones de cobre aumentadas.

Para estimar una concentración de cobre óptima sobre la actividad de rA13, una extrapolación de datos de la tabla 15 de P Frets frente a la concentración de cobre (figura 4) muestra que el efecto óptimo se alcanza probablemente a aproximadamente 2 µg/l, con una estimación conservadora de un efecto negativo por encima de aproximadamente 4 µg/l.

Tabla 15. Expresión de rA13 en cultivo celular de mamífero realizado en modo de cultivo continuo quimiostático usando medios que contienen concentraciones variables de cobre.

Escala de 10 l Experimento de I+D Media de 4 semanas de CST	ZZ-NC [10E6 células/ml]	P Frets [U/(l*d)]	q Frets [U/(10E9 células*d)]	Actividad espec. U/mg
0,66 µg/l Cu ²⁺	1,35	1322	1028	1759
1 µg/l Cu ²⁺	1,64	1962	1247	1690
4 µg/l Cu ²⁺	2,26	2960	1338	1768

Basándose en los resultados obtenidos anteriormente, se realizó un experimento adicional que comparó la expresión de rA13 en medios de cultivo celular que contenían 0,66 µg/l de cobre con 2,0 µg/l de cobre. Tal como se muestra en la tabla 16, la complementación de los medios celulares basales con cobre, con una concentración final de 2,0 µg/l de cobre, dio como resultado un aumento significativo de la productividad volumétrica (P) y específica (q) expresada como actividad de rA13 total producida por litro de cultivo y día y la actividad de rA13 total producida por célula y día, respectivamente, a lo largo de un periodo de 8 semanas. Los datos específicos para cada semana de producción de rA13 en los dos cultivos se muestran en la figura 5. A partir de estos datos, queda claro que la complementación con

cobre tiene un efecto beneficioso medible sobre el metabolismo celular, la tasa de crecimiento específica y la productividad de rA13.

5 Tabla 16. Expresión de rA13 en cultivo celular de mamífero realizado en modo de cultivo continuo quimiostático usando medios que contienen concentraciones variables de cobre.

Escala de 10 l Media de 8 semanas de CST	ZZ-NC [10E6 células/ml]	P Frets [U/(l*d)]	q Frets [U/(10E9 células*d)]	Actividad espec. U/mg
0,66 µg/l Cu ²⁺	1,29	1049	821	1862
2 µg/l Cu ²⁺	2,17	2470	1146	1749

Se entiende que los ejemplos y las realizaciones descritos en el presente documento son únicamente con propósitos ilustrativos.

REIVINDICACIONES

1. Disolución de cultivo celular que comprende medios de cultivo celular y una o más células que comprenden un ácido núcleo que codifica para una proteína de factor de von Willebrand recombinante (rvWF), en la que los medios de cultivo celular comprenden una concentración de cobre de al menos 2,4 µg/l y una concentración de amonio de no más de 4 mM.
2. Disolución de cultivo celular según la reivindicación 1, en la que la concentración de cobre es de desde 2,4 µg/l hasta 20 µg/l.
3. Disolución de cultivo celular según la reivindicación 2, en la que la concentración de cobre es de desde 2,4 µg/l hasta 8 µg/l.
4. Disolución de cultivo celular según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la disolución también contiene uno o más de los siguientes: calcio, cinc, uno o más vitaminas, y cualquier combinación de los mismos.
5. Disolución de cultivo celular según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el medio de cultivo es un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente.
6. Disolución de cultivo celular según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la densidad celular del cultivo se mantiene a menos de $2,5 \times 10^6$ células por ml, preferiblemente, a menos de $1,5 \times 10^6$ células por ml.
7. Composición que comprende factor de von Willebrand recombinante (rvWF), en la que la composición puede obtenerse mediante el método que comprende las siguientes etapas:
 - (a) proporcionar medios de cultivo celular basales;
 - (b) complementar los medios de cultivo celular basales con cobre para proporcionar una concentración final de cobre de entre 2,4 µg/l y 20 µg/l de cobre;
 - (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica para una proteína rvWF;
 - (d) cultivar la una o más células en los medios de cultivo celular complementados con cobre de manera que el rvWF se expresa en y se excreta de las células en un sobrenadante de cultivo en la que el contenido de NH_4^+ del sobrenadante de cultivo celular se mantiene a una concentración por debajo de 4 mM; y
 - (e) recuperar al menos una parte del sobrenadante de cultivo, en la que al menos el 20% del rvWF en la composición está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros.
8. Composición según la reivindicación 7, en la que al menos el 30% del rvWF está presente en un multímero de vWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros.
9. Composición que comprende factor de von Willebrand recombinante (rvWF), que tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica de al menos 80 mU/µg, en la que la composición puede obtenerse mediante el método que comprende las siguientes etapas:
 - (a) proporcionar medios de cultivo celular basales;
 - (b) complementar los medios de cultivo celular basales con cobre para proporcionar una concentración de cobre final de entre 2,4 µg/l y 20 µg/l de cobre;
 - (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica para una proteína rvWF;
 - (d) cultivar la una o más células en los medios de cultivo celular complementados con cobre de manera que el rvWF se expresa en y se excreta de las células en un sobrenadante de cultivo en la que el contenido de NH_4^+ del sobrenadante de cultivo celular se mantiene a una concentración por debajo de 4 mM; y

(e) recuperar al menos una parte del sobrenadante de cultivo.

10. Composición de factor de von Willebrand recombinante (rvWF), en la que la composición se prepara mediante el método que comprende las siguientes etapas:

- 5 (a) proporcionar medios de cultivo celular basales;
- (b) complementar los medios de cultivo celular basales con cobre para proporcionar una concentración de cobre final de entre 2,4 µg/l y 20 µg/l de cobre;
- 10 (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica para una proteína rvWF;
- (d) cultivar la una o más células en los medios de cultivo celular complementados con cobre de manera que el rvWF se expresa en y se excreta de las células en un sobrenadante de cultivo
- 15 en la que el contenido de NH_4^+ del sobrenadante de cultivo celular se mantiene a una concentración por debajo de 4 mM; y
- (e) recuperar al menos una parte del sobrenadante de cultivo,
- 20 en la que el sobrenadante recuperado tiene una actividad de cofactor de ristocetina específica para rvWF de al menos 30 mU/µg de rvWF.

11. Composición según la reivindicación 10, en la que la composición comprende además factor VIII recombinante (rFVIII).

12. Composición según la reivindicación 10 u 11, en la que la razón de rvWF con respecto a rFVIII es de al menos 10:1.

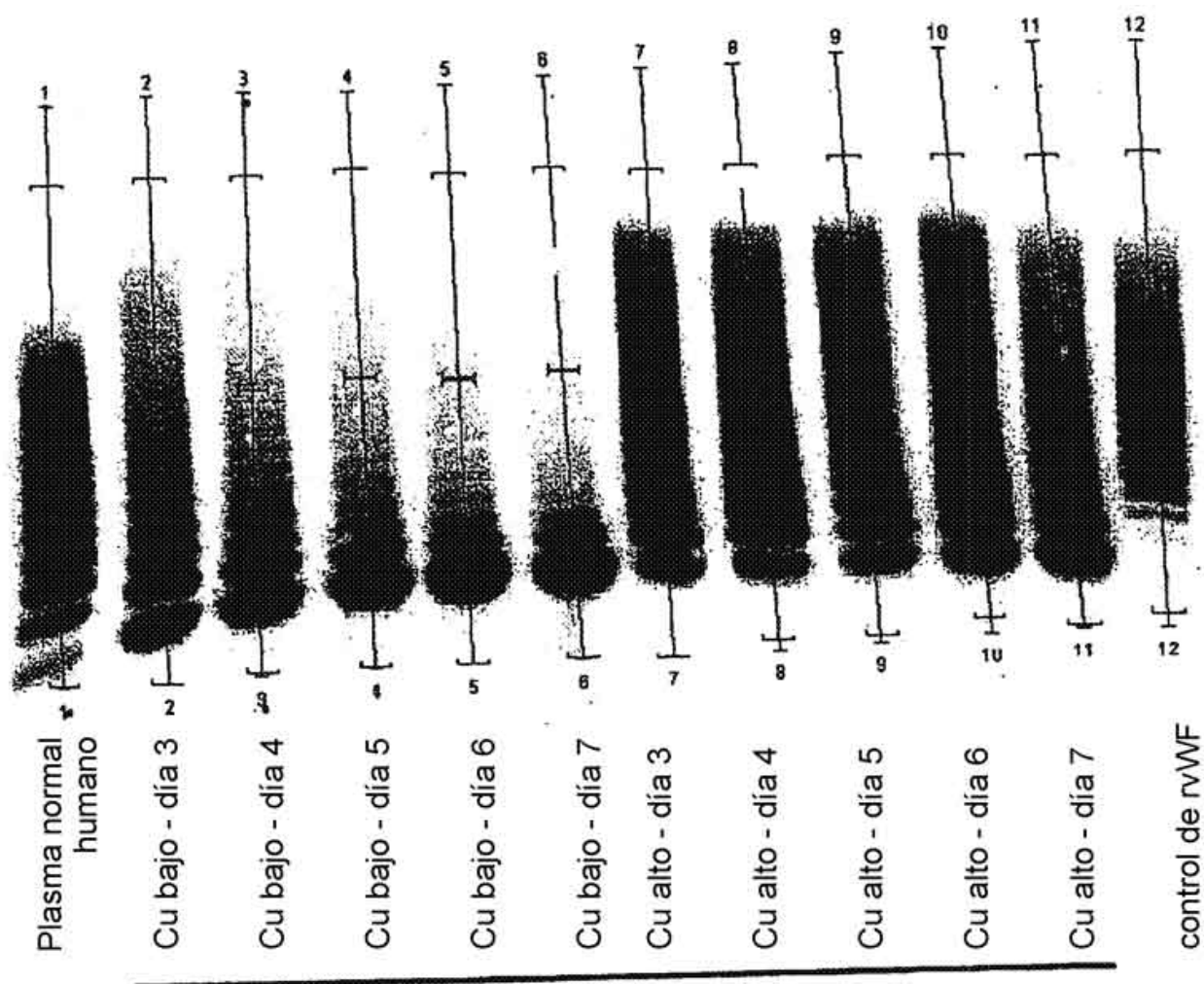


FIG. 1A

Número de carril	Número de banda	Traza Int x mm	Cant. relativa
1	1	809715.2	74.5
1	2	277519.7	25.5
2	1	681110.1	83.7
2	2	132376.5	16.3
3	1	568177	90.2
3	2	61619.3	9.8
4	1	500725.4	94.0
4	2	31815.3	6.0
5	1	433194.4	95.9
5	4	18307.3	4.1
6	1	412190.2	95.9
6	2	17441	4.1
7	1	842215.1	72.0
7	2	327960.1	28.0
8	1	723836.4	70.5
8	2	303095.4	29.5
9	1	739912.7	68.7
9	2	337575.1	31.3
10	1	929848.4	68.6
10	2	425784.2	31.4
11	1	684679.9	78.6
11	2	185964.5	21.4
12	3	512298.6	66.7
12	4	256326.7	33.3

FIG. 1B

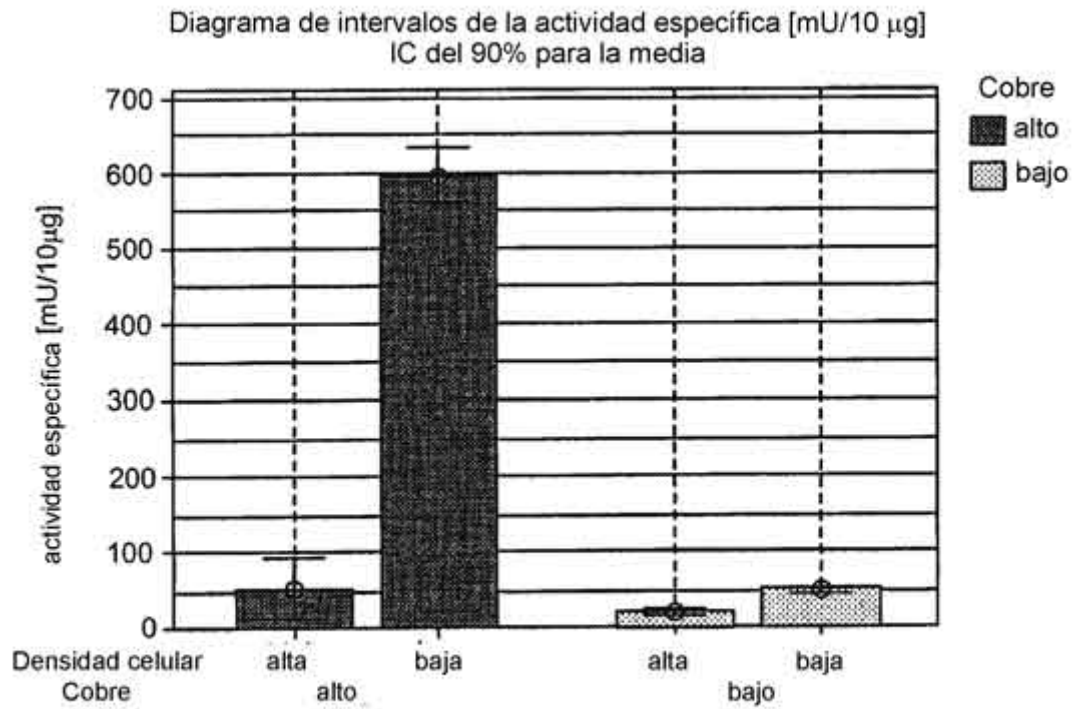


FIG. 2A

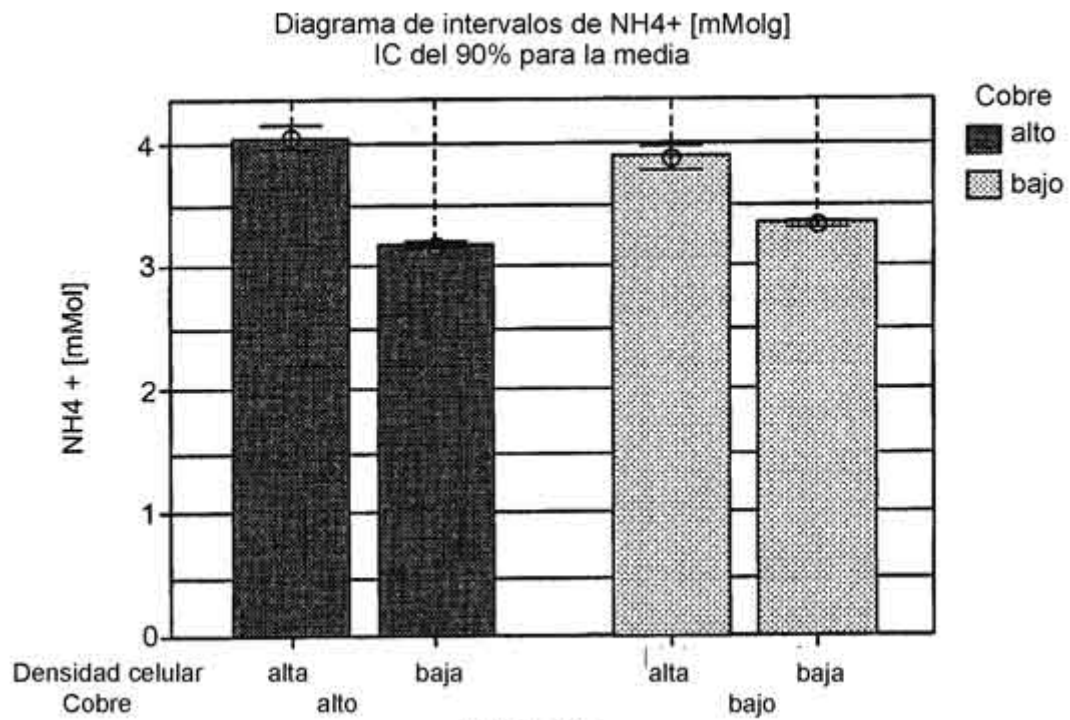


FIG. 2B

4 μ g/L 1 μ g/L 0.66 μ g/L

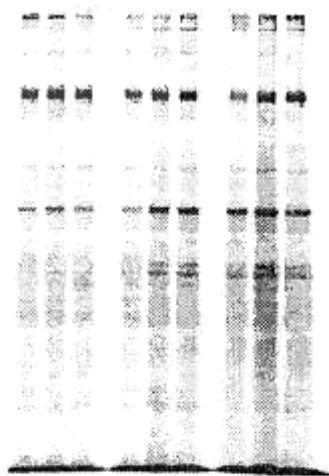


FIG. 3A

4 μ g/L 1 μ g/L 0.66 μ g/L



FIG. 3B

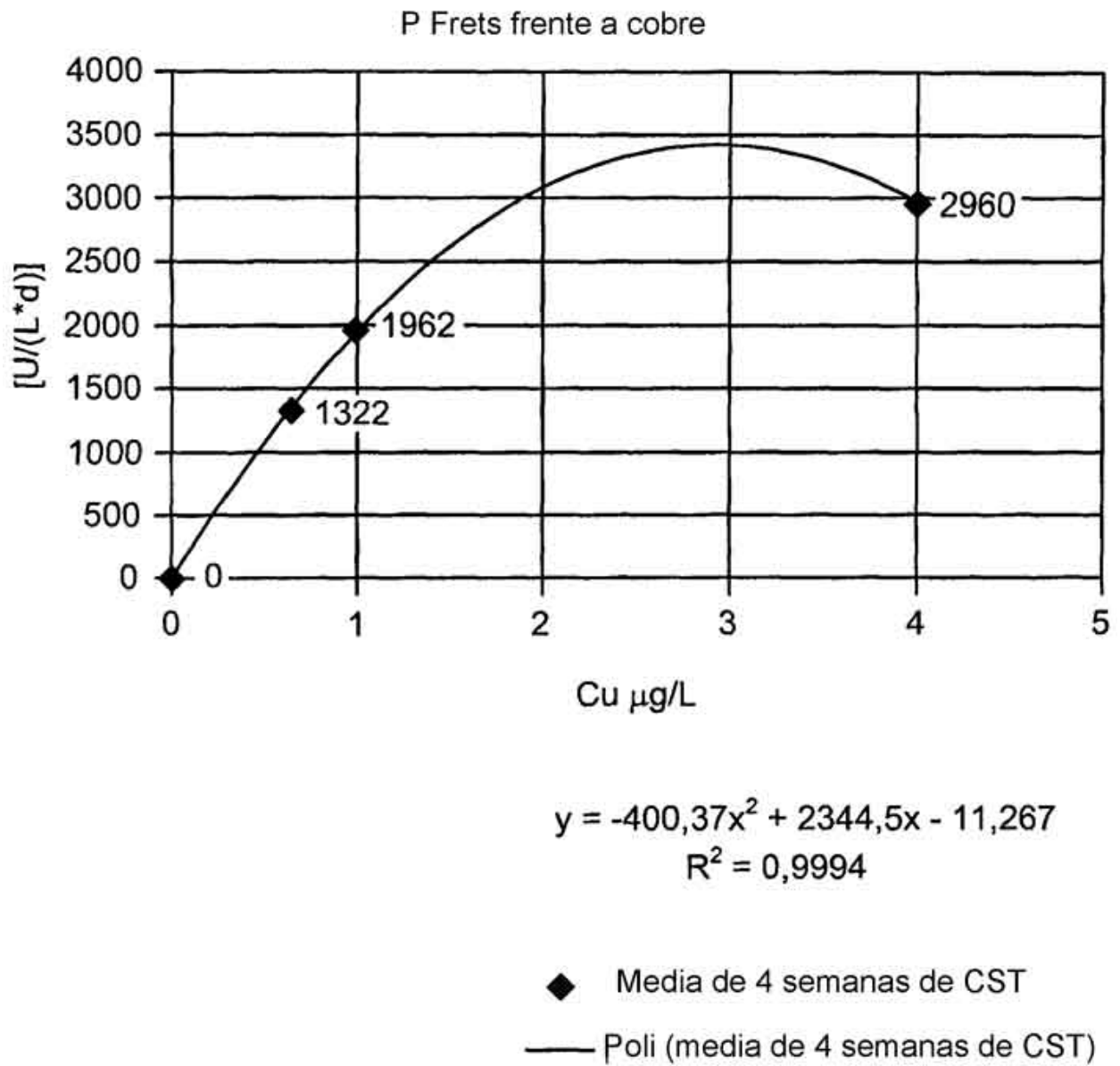


FIG. 4

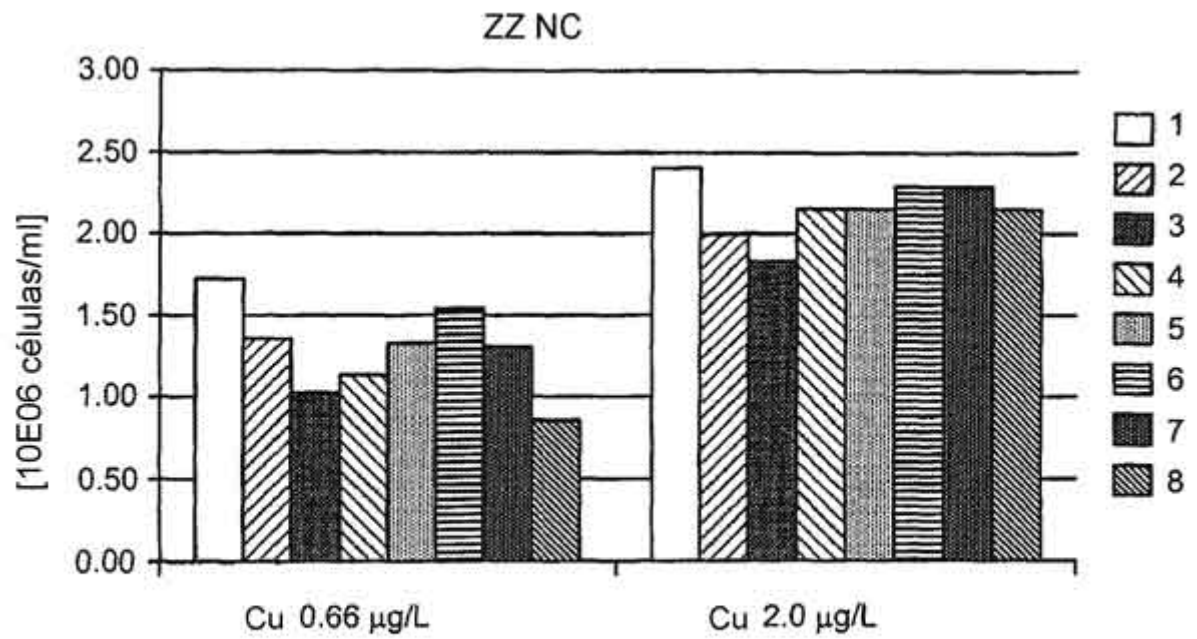


FIG. 5A

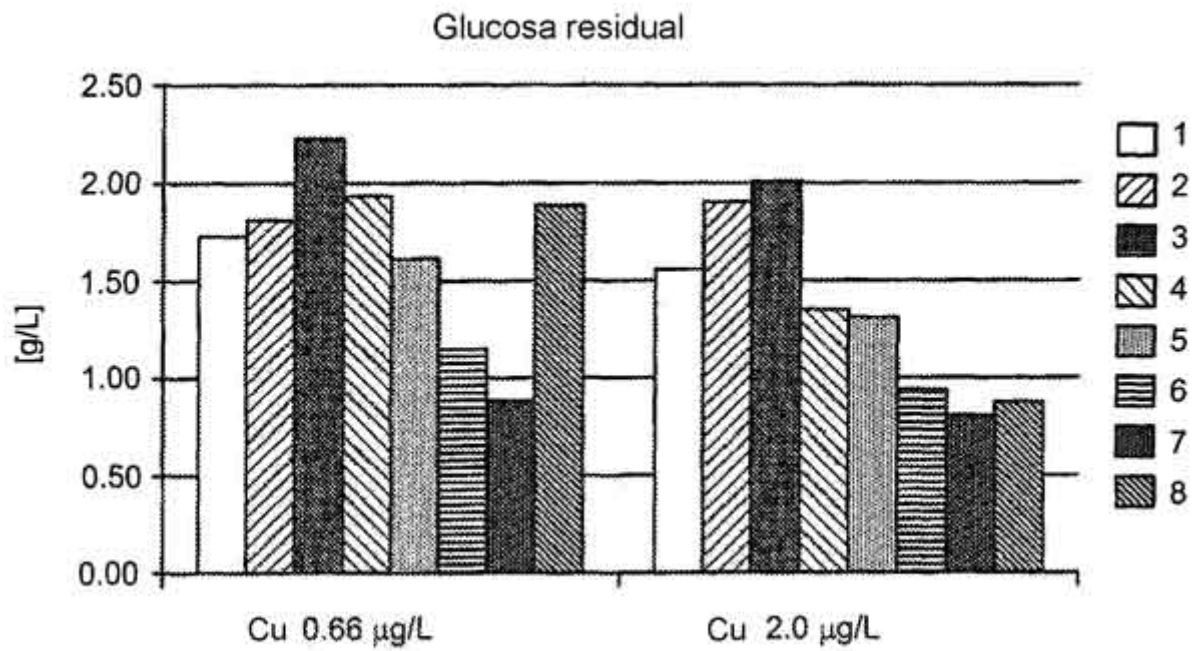


FIG. 5B

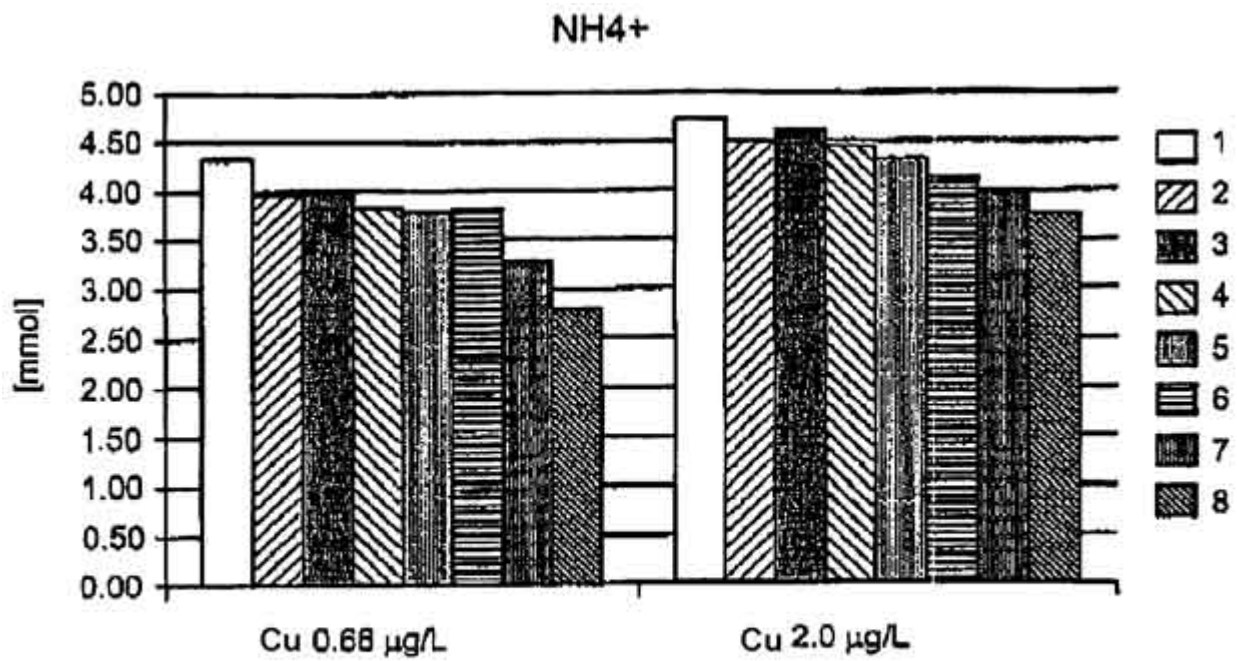


FIG. 5C

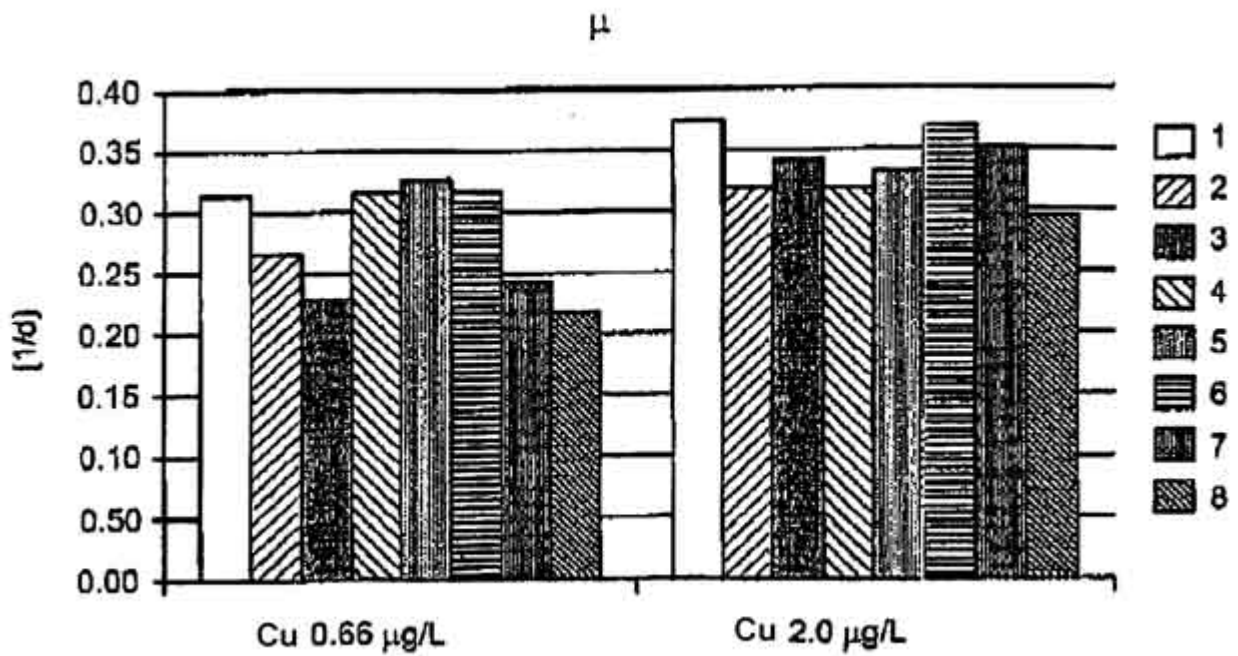


FIG. 5D

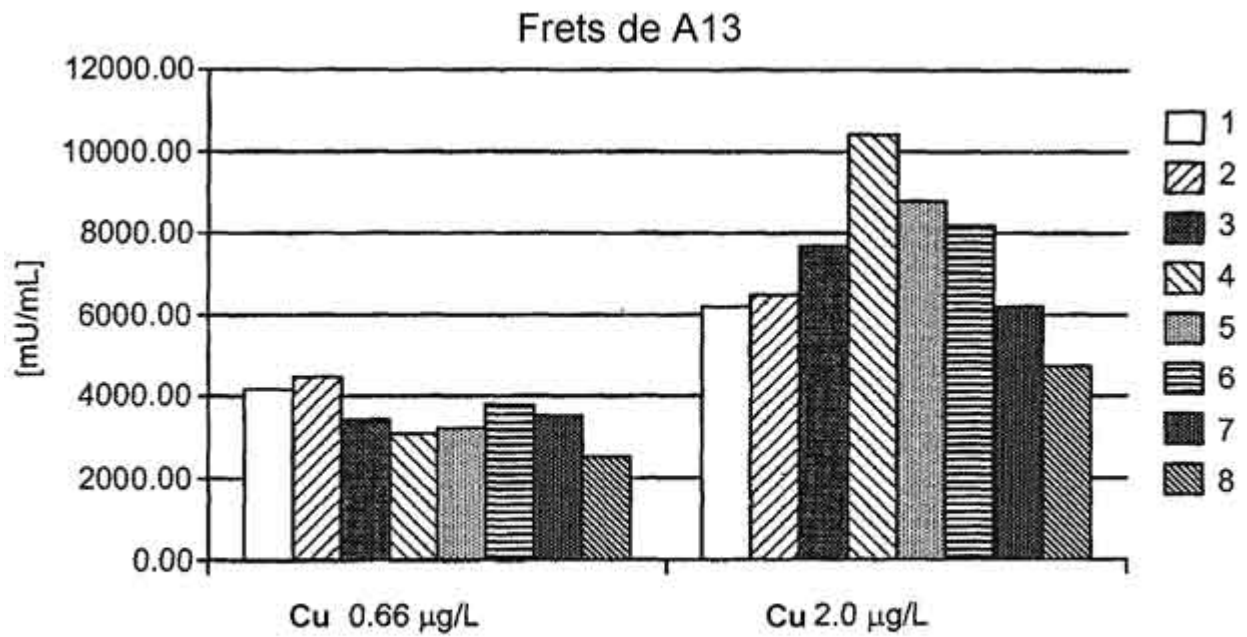


FIG. 5E

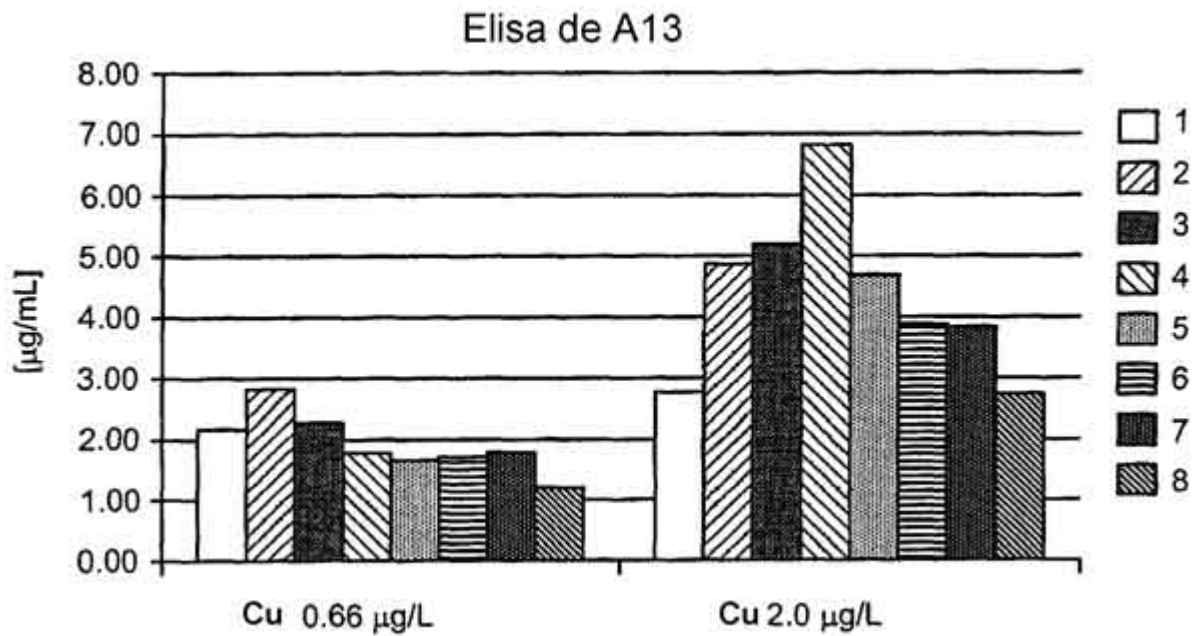


FIG. 5F

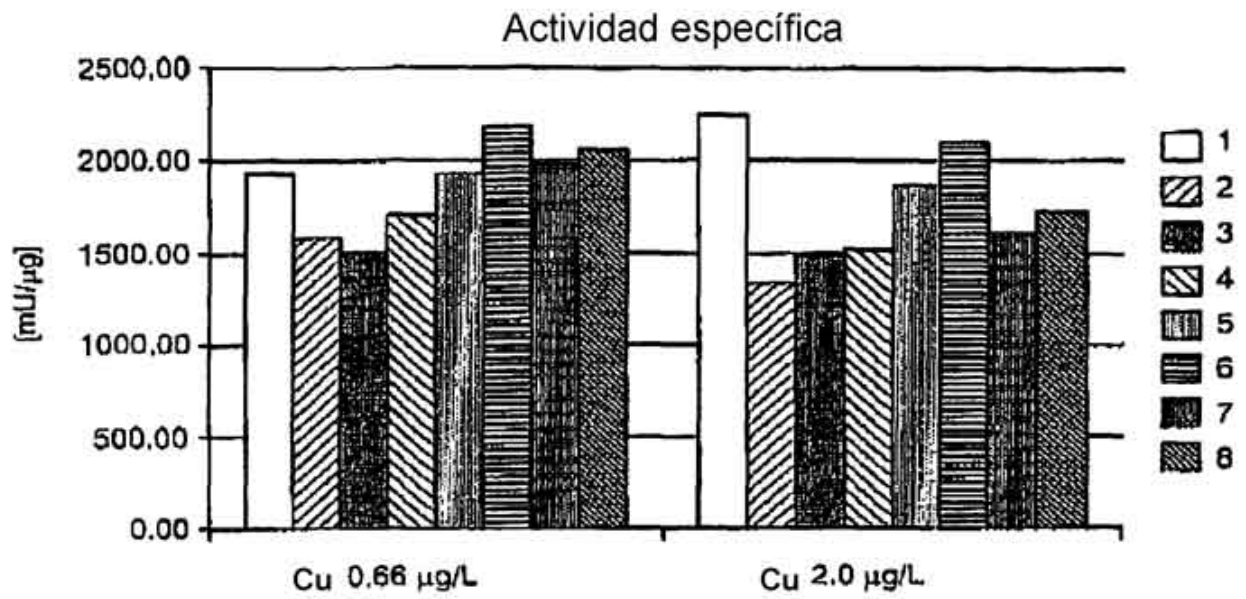


FIG. 5G

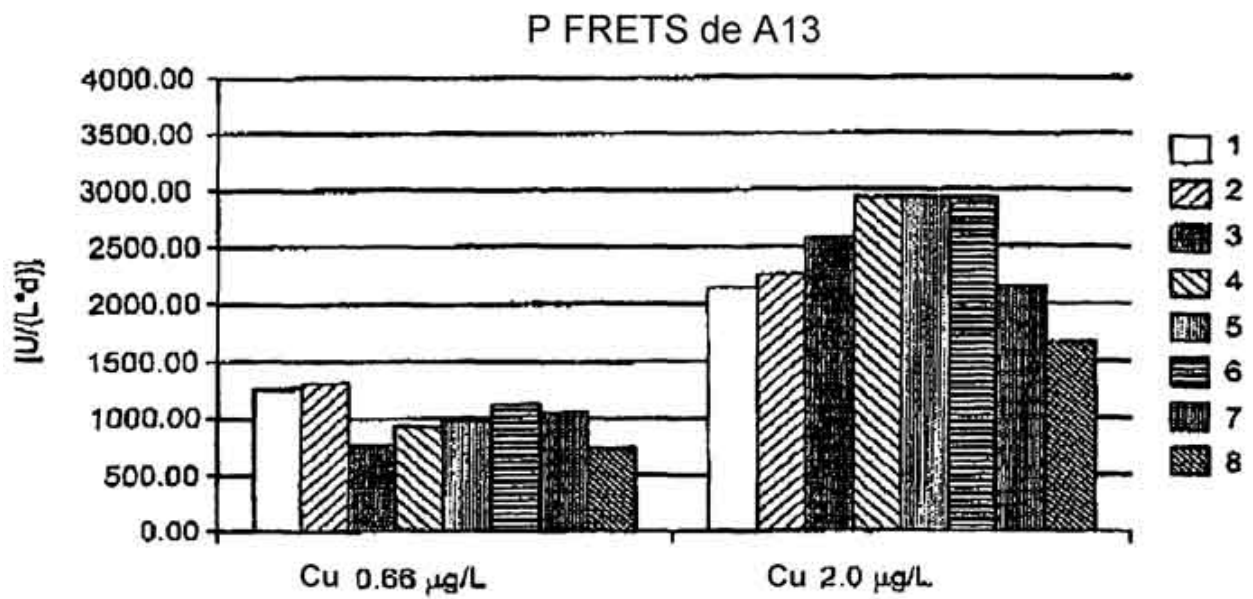


FIG. 5H

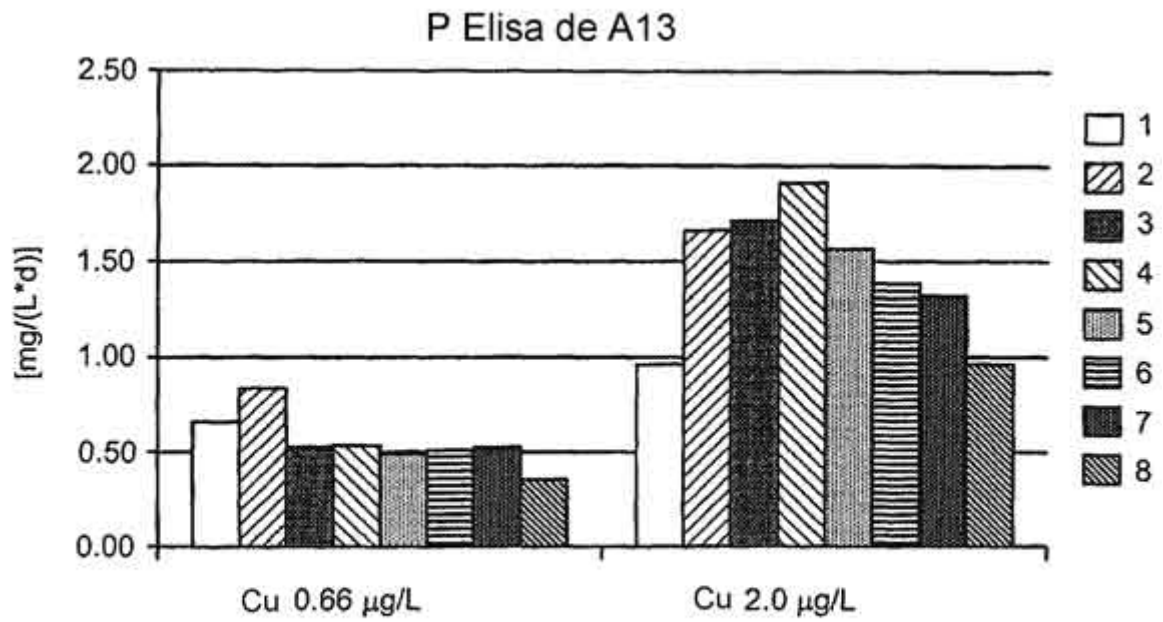


FIG. 5I

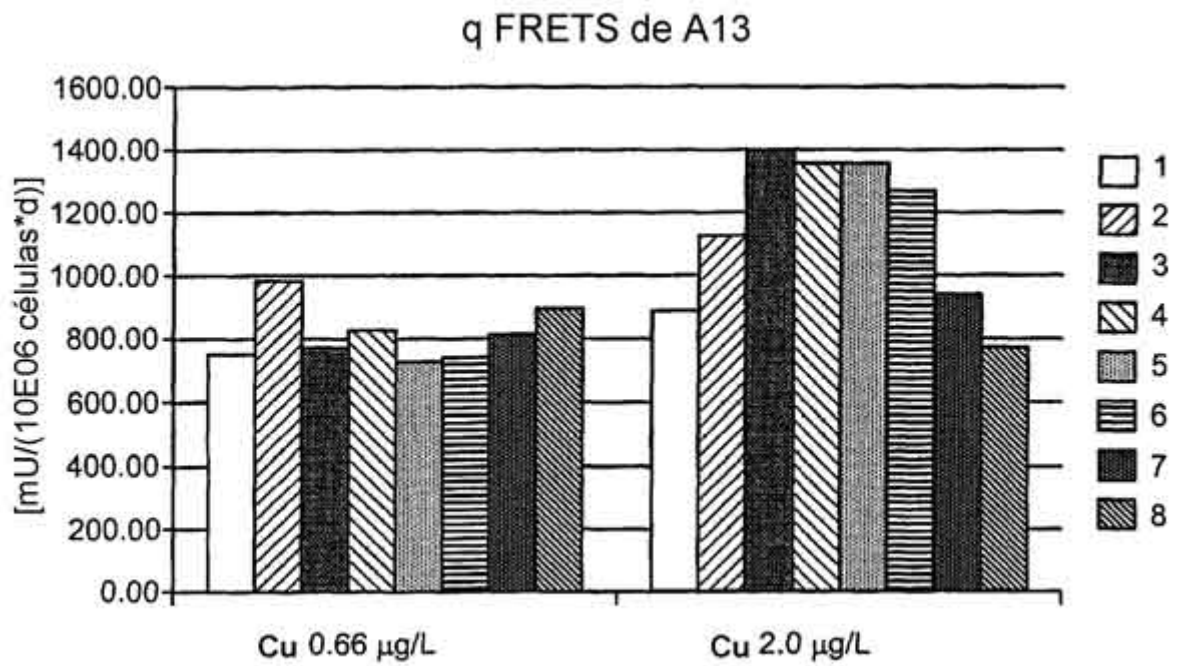


FIG. 5J

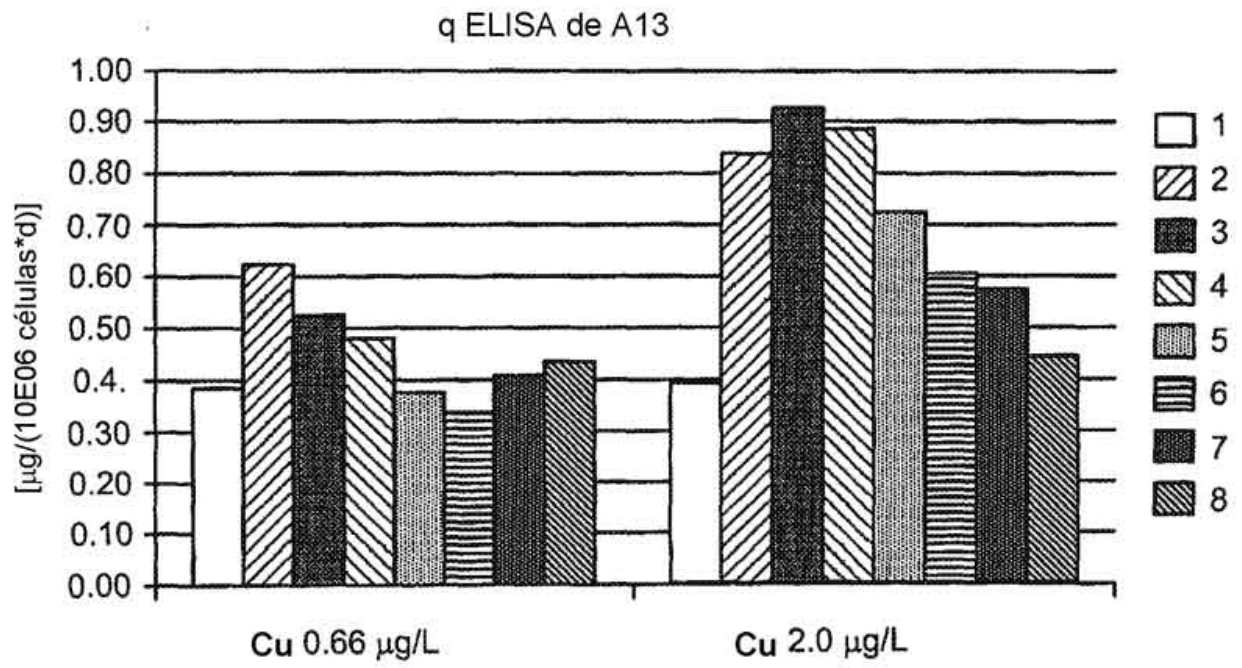


FIG. 5K

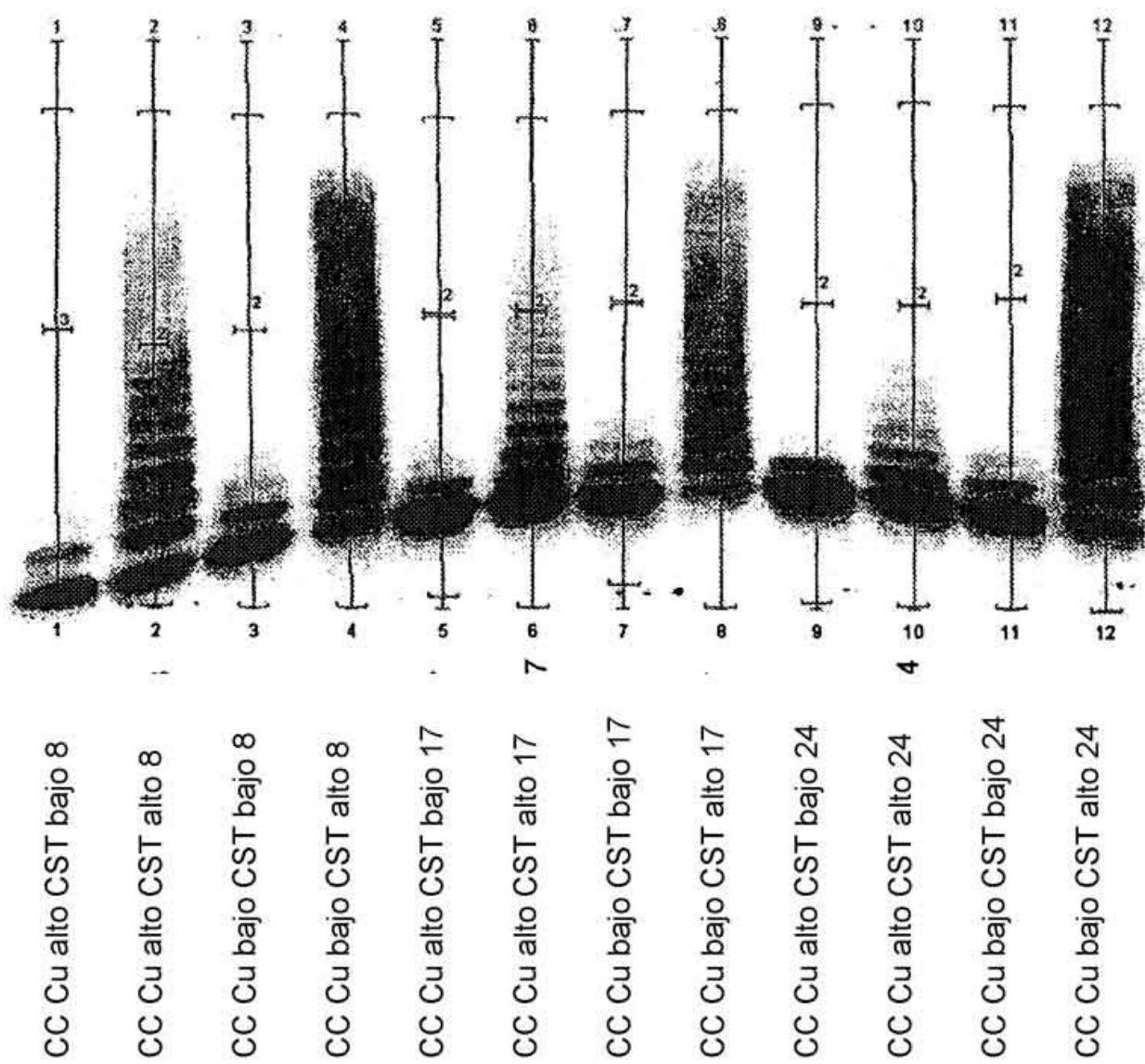


FIG. 6A

Número de carril	Número de banda	Traza Int x mm	Cant. relativa
1	1	155657.0	97.2
1	2	4453.3	2.8
2	1	419998.6	87.6
2	2	59416.6	12.4
3	1	225344.4	97.4
3	2	5898.2	2.6
4	1	557340.0	73.2
4	2	203807.5	26.8
5	1	248653.8	97.8
5	2	5599.8	2.2
6	1	434040.2	95.4
6	2	20823.4	4.6
7	1	238580.2	97.9
7	2	5159.7	2.1
8	1	322940.6	77.3
8	2	94677.8	22.7
9	1	250356.6	98.0
9	2	5183.5	2.0
10	1	275819.1	97.7
10	2	6469.7	2.3
11	1	207447.3	97.3
11	2	5687.5	2.7
12	1	604779.1	76.2
12	2	189356.4	23.8

FIG. 6B