

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 258**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2010 E 10740810 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2459702**

54 Título: **Medio de cultivo celular para expresión de proteína ADAMTS**

30 Prioridad:

31.07.2009 US 230477 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.09.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

GRILLBERGER, LEOPOLD;
SPENGER, ALEXANDRA;
HASSLACHER, MEINHARD;
GRILLBERGER, RANA y
REITER, MANFRED

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 583 258 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

Medio de cultivo celular para expresión de proteína ADAMTS

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n. ° 61/230.477 presentada el 31 de julio de 2009.

Declaración sobre los derechos a las invenciones realizadas según la investigación o desarrollo patrocinado federalmente

10 **Antecedentes de la invención**

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

30 Para el cultivo de células, particularmente de células eucariotas, y más específicamente de células de mamífero, hay una constante necesidad de usar medios de cultivo especiales que proporcionen las sustancias nutrientes que se requieren para el crecimiento eficaz de las células y para la producción de productos biológicos, especialmente productos biofarmacéuticos, tales como, por ejemplo, proteínas recombinantes, anticuerpos, virus, antígenos virales y partículas similares a virus. Para la producción eficaz de dichos productos biológicos, es importante lograr una densidad celular óptima, así como un aumento de la propia expresión de proteínas con el fin de obtener el máximo rendimiento del producto.

35 Las formulaciones de medios de cultivo celular se han complementado con diversos aditivos, incluidos componentes indefinidos como suero bovino fetal (FCS), diversas proteínas de origen animal y/o hidrolizados de proteínas de origen bovino, así como hidrolizados de proteínas de origen vegetal o derivados de levaduras.

40 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 los mismos. Además, se deben analizar los aditivos derivados de suero humano para detectar todos los virus conocidos, incluyendo el virus de la hepatitis y el VIH, que pueden transmitirse a través del suero. Además, el suero bovino y los productos derivados del mismo conllevan el riesgo de contaminación de EEB. Además, todos 45 los productos derivados de suero pueden contaminarse con sustancias desconocidas. Cuando se usan aditivos de suero o proteínas derivados de fuentes humanas o animales en cultivo celular, hay numerosos problemas (por ejemplo, la calidad variable de la composición de lotes diferentes y el riesgo de contaminación con *Mycoplasma*, virus o EEB), particularmente si las células se usan en la fabricación de fármacos o vacunas para su administración a seres humanos.

50 Por tanto, se han realizado muchos intentos para proporcionar sistemas huésped y condiciones de cultivo eficaces, que no requieran suero u otros compuestos proteicos de animales.

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

60 El documento WO 96/15231 da a conocer un medio libre de suero compuesto de un medio esencial mínimo sintético y un extracto de levadura para la propagación de células de vertebrados y un procedimiento de producción de virus. Una formulación de medio compuesta de medio de cultivo celular basal que comprende un péptido de arroz y un extracto de levadura y un producto de digestión enzimática del mismo, y/o un lípido vegetal para el crecimiento de células animales se da a conocer en el documento WO 98/15614. Un medio que comprende hidrolizado de soja

purificado para el cultivo de células recombinantes se da a conocer en el documento WO 01/23527. En el documento WO 00/03000 se da a conocer 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.

5 En el documento EP-A-0 481 791 se describe un medio de cultivo definido bioquímicamente para cultivar células CHO modificadas 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, peptona de soja digerida con papaína del 1 % al 0,025 % p/v y putrescina. En el documento WO 98/08934 se 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 diversos componentes derivados de animales, incluyendo albúmina, fetuína, diversas hormonas y otras proteínas. En este contexto, debe indicarse que se sabe que la putrescina también forma parte de un medio convencional como DMEM/F12 de Ham a una concentración de 0,08 mg/l.

15 Sin embargo, los hidrolizados de plantas y/o levaduras son mezclas indefinidas de oligopéptidos y otros componentes y contaminantes desconocidos. Además, la calidad de muchos de los hidrolizados disponibles comercialmente es muy variable. Como resultado, hay grandes variaciones en la producción de productos virales o proteínas recombinantes (una variación de hasta un factor de tres) en función de los lotes de 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. En el documento US 2007/0212770 se describen 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 de proteínas recombinantes.

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

30 La púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) es un trastorno caracterizado por microangiopatía trombótica, trombocitopenia y trombosis microvascular que pueden producir diversos grados de isquemia e infarto en el tejido. Clínicamente, los pacientes con PTT se diagnostican por síntomas tales como trombocitopenia, esquistocitos (fragmentos de eritrocitos) y niveles elevados de lactato deshidrogenasa (Moake J L. Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med*. 2002; 347:589-600; Moake J L. von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol*. 2004; 41:4-14; Sadler J E, Moake J L, Miyata T, George J N. Recent advances in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2004: 407-423; Sadler J E. New concepts in von Willebrand disease. *Annu Rev Med*. 2005; 56:173-191).

40 En 1982, Moake y col., encontraron multímeros del factor de von Willebrand inusualmente grandes (UL-vWF) en el plasma de los pacientes con PTT crónica con recaída (Moake J L, Rudy C K, Troll J H, Weinstein M J, Colannino N M, Azocar J, Seder R H, Hong S L, Deykin D. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*. 1982; 307:1432-1435). La relación entre UL-vWF y PTT obtuvo respaldo con los hallazgos independientes de Furlan y col., y Tsai y Lian de que la mayoría de los pacientes que padecen PTT tienen deficiencia de una metaloproteasa en plasma, que ahora se sabe que es ADAMTS13, que escinde el vWF (Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Wassmer M, Sandoz P, Laemmle B. Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 1997; 89:3097-3103; Tsai H M, Sussman I I, Ginsburg D, Lankhof H, Sixma J J, Nagel R L. Proteolytic cleavage of recombinant type 2A von Willebrand factor mutants R834W y R834Q: inhibition by doxycycline and by monoclonal antibody VP-1. *Blood*. 1997; 89:1954-1962; Tsai H M, Lian E C. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*. 1998; 339:1585-1594).

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

65 Se ha demostrado que mutaciones en el gen de ADAMTS13 producen PTT (Levy G G, Nichols W C, Lian E C,

Foroud T, McClintick J N, McGee B M, Yang A Y, Siemieniak D R, Stark K R, Gruppo R, Sarode R, Shurin S B, Chandrasekaran V, Stabler S P, Sabio H, Bouhassira E E, Upshaw J D, Jr., Ginsburg D, Tsai H M. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*. 2001; 413:488-494). La PTT idiopática, a menudo causada por autoanticuerpos que inhiben la actividad de ADAMTS-13, es un trastorno más frecuente que se produce en adultos y niños mayores, y que puede reaparecer a intervalos regulares en del 11 % al 36 % de los pacientes (Tsai H M, Lian E C. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*. 1998; 339:1585-1594; Furlan M, Lammle B. Deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease in familial and acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Baillieres Clin Haematol*. 1998; 11:509-514).

Los autoanticuerpos no neutralizantes también pueden inhibir la actividad de ADAMTS13 a través de la inducción del aclaramiento de la circulación (Scheiflinger F, Knobl P, Trattner B, Plaimauer B, Mohr G, Dockal M, Dorner F, Rieger M. Nonneutralizing IgM and IgG antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2003; 102:3241-3243). La actividad de ADAMTS13 en plasma en adultos sanos oscila entre el 50 % y el 178 % (Moake J L. Thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic uremic syndrome. *Arch Pathol Lab Med*. 2002; 126:1430-1433). En la mayoría de los pacientes con PTT familiar o adquirida, la actividad de ADAMTS13 en plasma está ausente o es menor del 5 % de la actividad normal. Sin tratamiento, la tasa de mortalidad para PTT supera el 90 %, pero la terapia plasmática ha reducido la mortalidad hasta aproximadamente el 20 % (Moake J L. Thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic uremic syndrome. *Arch Pathol Lab Med*. 2002; 126:1430-1433).

El vWF sintetizado en megacariocitos y células endoteliales se almacena en gránulos α de plaquetas y en cuerpos de Weibel-Palade, respectivamente, como vWF ultragrandes (UL-vWF) (Moake J L, Rudy C K, Troll J H, Weinstein M J, Colannino N M, Azocar J, Seder R H, Hong S L, Deykin D. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*. 1982; 307:1432-1435; Wagner D D, Olmsted J B, Marder V J. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol*. 1982; 95:355-360; Wagner D D, Bonfanti R. von Willebrand factor and the endothelium. *Mayo Clin Proc*. 1991; 66:621-627; Sporn L A, Marder V J, Wagner D D. von Willebrand factor released from Weibel-Palade bodies binds more avidly to extracellular matrix than that secreted constitutively. *Blood*. 1987; 69:1531-1534; Tsai H M, Nagel R L, Hatcher V B, Sussman I I. Endothelial cell-derived high molecular weight von Willebrand factor is converted into the plasma multimer pattern by granulocyte proteases. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989; 158:980-985; Tsai H M, Nagel R L, Hatcher V B, Sussman I I. Multimeric composition of endothelial cell-derived von Willebrand factor. *Blood*. 1989; 73:2074-2076). Una vez secretados por las células endoteliales, estos multímeros de UL-vWF se escinden mediante ADAMTS13 en circulación, para dar una serie de multímeros más pequeños en sitios de escisión específicos dentro de la molécula de vWF (Tsai H M, Nagel R L, Hatcher V B, Sussman I I. Endothelial cell-derived high molecular weight von Willebrand factor is converted into the plasma multimer pattern by granulocyte proteases. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989; 158:980-985; Dent J A, Galbusera M, Ruggeri Z M. Heterogeneity of plasma von Willebrand factor multimers resulting from proteolysis of the constituent subunit. *J Clin Invest* 1991; 88:774-782; Furlan M, Robles R, Affolter D, Meyer D, Baillod P, Lammle B. Triplet structure de von Willebrand factor reflects proteolytic degradation of high molecular weight multimers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:7503-7507).

ADAMTS13 escinde en la unión Tyr842-Met843 en el dominio A2 central de la subunidad de vWF madura y requiere cinc o calcio para su actividad (Dent J A, Berkowitz S D, Ware J, Kasper C K, Ruggeri Z M. Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87:6306-6310). El vWF existe en forma filamentosa y de "ovillo de hilo" tal como puede observarse mediante microscopia electrónica (Slayter H, Loscalzo J, Bockenstedt P, Handin R I. Native conformation of human von Willebrand protein. Analysis by electron microscopy and quasi-elastic light scattering. *J Biol. Chem*. 1985; 260:8559-8563). Además, la microscopia de fuerza atómica confirma que el vWF existe en una conformación global en condiciones estáticas y en un estado filamentoso no plegado tras la exposición a tensión de corte (Siedlecki C A, Lestini B J, Kottke-Marchant K K, Eppell S J, Wilson D L, Marchant R E. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood*. 1996; 88:2939-2950). Esto también podría producirse *in vivo* cuando un extremo del filamento de vWF está anclado a una superficie.

Los trombos de los pacientes con PTT consisten en poca fibrina y principalmente en vWF y plaquetas, lo que sugiere la agregación plaquetaria mediada por vWF como una causa de la trombosis (Asada Y, Sumiyoshi A, Hayashi T, Suzumiya J, Kaketani K. Immunohistochemistry of vascular lesion in thrombotic thrombocytopenic purpura, with special reference to factor VIII related antigen. *Thromb Res*. 1985; 38:469-479). Los pacientes con PTT recidivante tienen multímeros ultragrandes en el plasma. Los multímeros de UL-vWF se acumulan a lo largo del tiempo debido a que la persistencia del inhibidor (anticuerpo anti-ADAMTS13) disminuye la actividad de ADAMTS13. Los multímeros de UL-vWF son hiperactivos y no están plegados como resultado de la tensión de corte que produce la agregación plaquetaria, lo que da como resultado trombosis intravascular (Tsai H M. Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Mol Med*. 2002; 80:639-647; Tsai H M. Deficiency of ADAMTS-13 in thrombotic and thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. 2003; 1:2038-2040; discussion 2040-2035).

Se cree que la presencia de multímeros de UL-vWF hiperreactivos en el plasma debido a deficiencia de ADAMTS13

podría estar asociada con aumento del riesgo de trombosis arterial relacionada con cardiopatía coronaria.

Puesto que las proteínas ADAMTS se han implicado en numerosas enfermedades y afecciones, existe la necesidad en la técnica de procedimientos de producción a gran escala de proteínas ADAMTS recombinantes que tienen actividades específicas altas, que son adecuadas para la formulación y administración farmacéuticas. La presente invención proporciona procedimientos que satisfacen estas y otras necesidades en la técnica para la producción y purificación de proteínas ADAMTS.

Breve resumen de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos de expresión de una proteína desintegrina y metaloproteínasa con motivos de trombospondina (ADAMTS). En determinadas realizaciones, los procedimientos proporcionados en el presente documento dan como resultado, ventajosamente, niveles de expresión aumentados y la producción de proteínas ADAMTS con actividades sustancialmente mejoradas. Estas propiedades mejoradas pueden lograrse, en un ejemplo, complementando el medio de cultivo usado para la expresión de proteínas ADAMTS con niveles aumentados de diversos componentes, tales como calcio, cinc o nicotinamida (vitamina B3). En una realización preferente, la proteína ADAMTS es una proteína ADAMTS13.

En otro aspecto, la invención se refiere un procedimientos de aumento de los niveles de expresión y/o de actividad de una proteína ADAMTS cultivando células recombinantes que albergan un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS en medios libres de proteínas animales y definidos químicamente en condiciones de cultivo celular discontinuo, semicontinuo o continuo. En algunas realizaciones, estos procedimientos comprenden el uso de cultivo celular discontinuo, semicontinuo, en perfusión o en quimioestado que puede realizarse o bien en suspensión celular o bien formas adherentes de células. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es una proteína ADAMTS13.

En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos de reducción de la cantidad de pérdida de actividad durante la purificación de una proteína ADAMTS. En determinadas realizaciones, los procedimientos comprenden complementar tampones de purificación con niveles adicionales de calcio y/o cinc. En una realización específica, los procedimientos se refieren a estabilizar la actividad de una proteína ADAMTS durante las etapas de ultrafiltración y/o de diafiltración usadas durante la purificación. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es una proteína ADAMTS13.

Aún en otro aspecto, la presente invención se refiere a procedimientos de producción de una proteína ADAMTS con actividad aumentada para su uso en la preparación de una composición farmacéutica. En determinadas realizaciones, estos procedimientos comprenden el uso de medios de cultivo libres de proteínas animales y/o definidos químicamente en condiciones adecuadas para la expresión aumentada de una proteína ADAMTS que tiene actividades aumentadas. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es una proteína ADAMTS13.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona medios libres de proteínas animales, libres de oligopéptidos y definidos químicamente que son útiles para la expresión de proteínas ADAMTS que tienen actividades específicas altas. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es una proteína ADAMTS13.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Productividad volumétrica de ADAMTS13 humana recombinante mediante FRETs-WWF73 expresada en células CHO cultivadas en medio libre de proteínas animales en diversas condiciones de temperatura y pH. Los resultados de los diversos experimentos de cultivo celular se muestran como (A) diagrama de contorno y (B) representaciones de diagrama de superficie de productividad volumétrica normalizada de ADAMTS13 mediante FRETs-WWF73 en función de la temperatura y el pH del cultivo.

Figura 2. Niveles de actividad específica (FRETs-WWF73 / antígeno mediante ELISA) de células CHO que expresan ADAMTS13 humana recombinante cultivada en medio libre de proteínas animales en diversas condiciones de temperatura y pH. Los resultados de los diversos experimentos de cultivo celular se muestran como (A) diagrama de contorno y (B) representaciones de diagrama de superficie de actividad específica en función de la temperatura y el pH del cultivo.

Descripción detallada de la invención

I. Introducción

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 dominios centrales común que consiste en un péptido señal, seguido por un prodominio, un dominio catalítico de metaloproteínasa dependiente de cinc, un dominio similar a desintegrina, una repetición de trombospondina 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 trombospondina 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 metaloproteínasa (Andreini y col., *J. Proteome Res.*, 2005, 4 (3), págs. 881-888).

Se han notificado los papeles biológicos para las proteínas ADAMTS para diversas enfermedades y afecciones, incluyendo, antiangiogénesis, fibrosis intersticial renal, remodelación ósea, foliculogénesis ovárica, aterosclerosis, desarrollo genitourinario y crecimiento/remodelación tumoral (ADAMTS-1); síndrome de Ehler-Danlos de tipo 7C y dermatopraxis bovina (ADAMTS-2); artritis, aterosclerosis y tendinopatía (ADAMTS-4); artritis y glioblastoma (ADAMTS-5); artritis (ADAMTS-7); antiangiogénesis, neoplasias malignas cerebrales, artritis y aterosclerosis (ADAMTS-8); artritis (ADAMTS-9, -12); púrpura trombocitopénica trombótica (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 actividades específicas altas, expresadas como la razón de actividad, medida mediante el ensayo de FRET-S-VWF73, con respecto al contenido de antígenos, tal como se determina mediante ELISA. En un aspecto, los procedimientos proporcionados en el presente documento se basan en diversos hallazgos ventajosos que permiten la expresión de cultivo celular de A13 que tiene niveles aumentados de actividad total y específica.

Los estudios descritos en el presente documento demuestran que para la expresión de A13 activa se requiere una determinada concentración mínima de calcio en el medio de cultivo, de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 1,5 mM. Adicionalmente, se encontró que complementando el medio de cultivo con niveles aumentados de cinc, la proteína A13 expresada resultante tenía actividades totales y específicas superiores. Por ejemplo, en cultivos complementados con cinc adicional de 2 a 3 veces la concentración normal, en comparación con las concentraciones encontradas en medios definidos químicamente convencionales tales como medios basados en DMEM/F12, se aumentaba significativamente la actividad específica de A13. Además, podía lograrse un aumento adicional en la actividad específica de A13 aumentando la concentración de nicotinamida (vitamina B3) desde aproximadamente 2 mg/l, como en los medios basados en DMEM/F12 convencionales, hasta aproximadamente 7 mg/l. Cultivando células HEK293 o CHO recombinantes en medios complementados con calcio, cinc y/o nicotinamida adicional, pudieron lograrse actividades específicas de al menos aproximadamente 500 mU/μg, 1.000 mU/μg, hasta aproximadamente 2.000 mU/μg en cultivos de expresión a gran escala de A13 humana recombinante. Estos niveles de actividad específica para las proteínas A13 producidas de manera recombinante no se habían notificado con anterioridad. Ventajosamente, estos niveles aumentados de actividad de A13 se lograron en medio definido químicamente libre de componentes derivados de animales, lo que permite la expresión de proteínas ADAMTS de manera sistemática y reproducible a gran escala adecuada para la producción de proteínas para la formulación farmacéutica. Además, estos medios están incluso libres de proteínas recombinantes, por ejemplo insulina, dando como resultado productos que pueden usarse de manera más segura en formulaciones para administración farmacéutica.

La presente divulgación también proporciona procedimientos que impiden la pérdida de actividad y actividad específica durante etapas de ultra/diafiltración convencionales y otras etapas de purificación. Ventajosamente, se encontró que complementando el tampón usado para la diafiltración con calcio y cinc adicionales, podía lograrse una reducción significativa en la pérdida de actividad de A13, tal como se mide mediante un ensayo de FRET-S-VWF73.

Por consiguiente, debido a la relación función-estructura compartida entre la familia ADAMTS de metaloproteínas secretadas, los procedimientos proporcionados por la presente invención permiten la expresión de todas las proteínas ADAMTS en cultivo celular y la recuperación del medio celular.

II. Definiciones

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 medio usado en los procedimientos de la presente invención.

Tal como se usa en el presente documento, una "proteína ADAMTS" se refiere a un polipéptido de la familia de metaloproteínas de desintegrina y metaloproteínasa con motivos de trombospondina de tipo I. Los miembros de esta familia incluyen las proteínas humanas ADAMTS1 (NM_006988), ADAMTS2 (NM_014244; NM_021599), ADAMTS3 (NM_014243), ADAMTS4 (NM_005099), ADAMTS5 (NM_007038), ADAMTS6 (NM_014273), ADAMTS7 (NM_0142727), ADAMTS8 (NM_007037), ADAMTS9 (NM_182920; NM_182921; NM_020249), ADAMTS10 (NM_030957), ADAMTS 12 (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 presentan 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 de manera postraducciona l o bien *in vivo* o bien *in vitro*, por ejemplo, mediante medios enzimáticos o químicos. Se entiende que las proteínas ADAMTS de la presente invención incluyen alternativamente isoformas sometidas a empalme, proteínas modificadas de manera conservativa, proteínas sustancialmente idénticas, homólogos y similares.

En el contexto de la presente invención, una proteína ADAMTS abarca cualquier miembro de la familia ADAMTS de, por ejemplo, un mamífero tal como un primate, ser 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, ya que son fragmentos funcionales y proteínas de fusión de las proteínas ADAMTS. Además, las proteínas ADAMTS de la invención pueden comprender además etiquetas que facilitan la purificación, detección o ambas. Las proteínas ADAMTS descritas en el presente documento pueden modificarse además con un resto terapéutico o un resto adecuado para la obtención de imágenes *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 ADAMTS13, 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 a los aminoácidos de 75 a 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 de NP_620596 (isoforma 2 de ADAMTS13, preproteína) o a los aminoácidos de 75 a 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 ADAMTS13, preproteína) o a los aminoácidos de 75 a 1340 de NP_620595 (isoforma 1 de ADAMTS13, polipéptido maduro). Tal como se usa en el presente documento, una proteína ADAMTS13 incluye variantes naturales con actividad de escisión de vWF y construcciones artificiales con actividad de escisión de vWF. Tal como se usa en la presente invención, ADAMTS13 engloba cualquier variante natural, secuencia alternativa, isoforma o proteína mutante que conserve 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 púrpura trombocitopénica trombótica (PTT). Las proteínas ADAMTS13 también incluyen polipéptidos que contienen modificaciones postraduccionales. Por ejemplo, se ha demostrado que ADAMTS13 va a modificarse 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 esta forma.

Puede prepararse ADAMTS13 recombinante proteolíticamente activa mediante la expresión en cultivos celulares de mamífero, tal como se describe en Plaimauer y col.,(2002, *Blood*. 15; 100(10):3626-32) y documento US 2005/0266528. En Plaimauer B, Scheiflinger F. (Semin Hematol. Enero de 2004; 41(1):24-33 se dan a conocer procedimientos de cultivo recombinante de células que expresan ADAMTS13.

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 reunido, independientemente del ensayo que esté usándose. Por ejemplo, cuando la proteína ADAMTS es ADAMTS13, una unidad de actividad de ADAMTS13 mediante FRET-S-VWF73 es la cantidad de actividad necesaria para escindir la misma cantidad de sustrato de FRET-S-VWF73 (Kokame y col., *Br J Haematol*. Abril de 2005; 129(1):93-100) que se escinde por un ml de plasma humano normal reunido. 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 y col., *Br J Haematol*. Septiembre de 2008; 6(9): 1534-41). Un procedimiento preferente de determinación de actividad de ADAMTS13 humana recombinante se da a conocer en Gerritsen y col., (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 (PTT). *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 el 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 procedimiento de ELISA dado a conocer en Rieger y col.,(2006, *Thromb Haemost*. 2006 95(2):212- 20).

Tal como se usa en el presente documento, “µg de ADAMTS13” o “µg de antígeno de ADAMTS13” significa una cantidad de ADAMTS13 que proporciona el mismo nivel de proteína detectable mediante ensayo ELISA que 1 ml de plasma humano normal reunido. Esto se basa en estimaciones publicadas de que está presente 1 mg de ADAMTS13 en 1 ml de plasma humano normal, y por tanto es una medición aproximada.

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. Esto puede incluir cualquier procedimiento conocido en la técnica para (i) la producción de ADN recombinante mediante ingeniería genética, por ejemplo, a través de 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 tras inducción, y (v) aislar dicha proteína ADAMTS, por ejemplo, del medio de cultivo o recogiendo las células transformadas, con el fin de (vi) obtener proteínas ADAMTS recombinantes sustancialmente purificadas, por ejemplo, a través de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba, y similares. El término “derivado biológicamente activo” incluye también moléculas quiméricas tales como por ejemplo una proteína ADAMTS, o un 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 propiedades biológicas/farmacológicas como por ejemplo, la semivida de la proteína ADAMTS en el sistema circulatorio de un mamífero, particularmente un ser humano.

Tal como se usa en el presente documento, el término “ultrafiltración” engloba una variedad de procedimientos de filtración de membrana en los que la presión hidrostática fuerza un líquido contra una membrana semi-permeable. Los sólidos y solutos suspendidos de alto peso molecular quedan retenidos, mientras que el agua y los solutos de bajo peso molecular pasan a través de la membrana. Este procedimiento de separación se usa a menudo para purificar y concentrar disoluciones macromoleculares (10^3 - 10^6 Da), especialmente disoluciones de proteínas. Están disponibles varias membranas de ultrafiltración dependiendo del tamaño de las moléculas que retienen. La ultrafiltración se caracteriza normalmente por un tamaño de poro de membrana de entre 2 nm y 0,05 µm y presiones de funcionamiento de entre 1 y 10 bar, y es particularmente útil para separar proteínas similares a coloides de pequeñas moléculas como azúcares y sales. En contraposición, la nanofiltración es otro procedimiento de filtración accionado por presión caracterizado normalmente por un tamaño de poro de membrana de entre 0,5 y 2 nm y presiones de funcionamiento de entre 5 y 40 bar. La nanofiltración se usa frecuentemente para lograr una separación entre azúcares, otras moléculas orgánicas y sales multivalentes por un lado, y sales monovalentes y agua por otro. Generalmente, la ultrafiltración puede realizarse o bien en modo de filtración en línea o bien en modo de filtración de flujo tangencial (FFT).

Tal como se usa en el presente documento, el término “diafiltración” se refiere a otro procedimiento de filtración de membrana, denominado en ocasiones como filtración de flujo tangencial (FFT), en el que el líquido se bombea de manera tangencial a lo largo de la superficie de una membrana de ultrafiltración. Normalmente, el líquido retenido se diluye con tampón de diafiltración tras pasar sobre la membrana y posteriormente se devuelve a la membrana en un procedimiento de flujo continuo. Generalmente, la diafiltración puede realizarse o bien en modo de filtración en línea o bien en modo de filtración de flujo tangencial (FFT). Como tal, puede usarse un único sistema para ambas operaciones de ultrafiltración y diafiltración, por ejemplo, para concentrar primero la muestra usando ultrafiltración y realizar después intercambio de tampón mediante diafiltración.

Tal como se usa en el presente documento, el término “poliamina” se refiere a cualquiera de un grupo de compuestos orgánicos compuestos de carbono, nitrógeno e hidrógeno, y que contienen dos o más grupos amino. Por ejemplo, el término engloba moléculas seleccionadas del grupo que consiste en cadaverina, putrescina, agmatina, ornitina, espermina y espermidina.

En determinadas realizaciones del medio de cultivo definido químicamente usado para la expresión de una proteína ADAMTS, la concentración de la poliamina está presente en el medio en una concentración que oscila entre aproximadamente 0,5 mg/l y aproximadamente 30 mg/l, o entre aproximadamente 0,5 mg/l y aproximadamente 20 mg/l, o entre aproximadamente 0,5 mg/l y aproximadamente 10 mg/l, o entre aproximadamente 1 mg/l y aproximadamente 10 mg/l, o entre aproximadamente 2 mg/l y aproximadamente 10 mg/l, o entre aproximadamente 2 mg/l y aproximadamente 8 mg/l, o entre aproximadamente 2 mg/l y aproximadamente 5 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina a una concentración de desde aproximadamente 2 mg/l hasta aproximadamente 8 mg/l.

Tal como se usa en el presente documento, el término “medio definido 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 individuales derivados de plantas o animales (por ejemplo, proteínas, polipéptidos, etc.). Los ejemplos no limitativos de medios definidos químicamente disponibles comercialmente incluyen, diversos medios EXCELL[®] (SAFC Biosciences, Inc.), 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) y

similares. Se conocen en la técnica procedimientos de preparación de medios de cultivo definidos químicamente, por ejemplo en las patentes estadounidenses números 6.171.825 y 6.936.441, documento WO 2007/077217 y publicaciones de solicitud de patente estadounidense números 2008/0009040 y 2007/0212770.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “medio de cultivo libre 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 procedimientos de preparación de medio de cultivo libre de oligopéptidos, por ejemplo, en las patentes estadounidenses números 6.171.825 y 6.936.441, documento WO 2007/077217 y publicaciones de solicitud de patente estadounidense números 2008/0009040 y 2007/0212770.

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

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “medio de cultivo libre de proteínas animales” se refiere a un medio de cultivo que no está complementado con un suero, proteína o fracción de proteínas animal. Aunque con frecuencia 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 procedimientos de preparación de medio de cultivo libre de proteínas animales, por ejemplo en las patentes estadounidenses números 6.171.825 y 6.936.441, documento WO 2007/077217 y publicaciones de solicitud de patente estadounidense números 2008/0009040 y 2007/0212770.

35 Un “vector de expresión” es una construcción de ácido nucleico, generada de manera recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula huésped. El vector de expresión puede formar parte de un plásmido, virus o fragmento de ácido nucleico. Normalmente, el vector de expresión incluye un ácido nucleico que va a transcribirse unido operativamente a un promotor.

40 El término “heterólogo” cuando se usa con referencia a partes de un ácido nucleico indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico se produce normalmente de manera recombinante, teniendo dos o más secuencias de genes no relacionados dispuestos para obtener un nuevo ácido nucleico funcional, por ejemplo, un promotor procedente de una fuente y una región codificante procedente de otra fuente. De manera similar, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (por ejemplo, una proteína de fusión).

50 Un “promotor” se define como una serie de secuencias de control de ácido nucleico que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Tal como se usa en el presente documento, un promotor incluye secuencias de ácido nucleico necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción, tales como, en el caso de un promotor de tipo polimerasa II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente elementos de promotor o represor distales, que pueden ubicarse tanto como sea posible varios miles de pares de bases del sitio de inicio de la transcripción. Un promotor “constitutivo” es un promotor que es activo en la mayoría de las condiciones medioambientales y de desarrollo. Un promotor “inducible” es un promotor que es activo en regulación medioambiental o de desarrollo. El término “unido operativamente” se refiere a una unión funcional entre una secuencia de control de expresión de ácido nucleico (tal como un promotor, o serie de sitios de unión de factores de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en el que la secuencia de control de expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

60 Tal como se usa en el presente documento, el término “aproximadamente” indica un intervalo aproximado de más o menos el 10 % de un valor especificado. Por ejemplo, la expresión “aproximadamente el 20 %” engloba un intervalo del 18-22 %.

65 III. Expresión de proteínas ADAMTS

En un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos de expresión de una proteína desintegrina y

metalo proteínasa con motivos de trombospondina (ADAMTS) que tiene actividad específica alta. En una realización, el procedimiento comprende cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS en medio de cultivo complementado con al menos un componente seleccionado de calcio, cinc y nicotinamida (vitamina B3). En una realización específica, una proteína ADAMTS se expresa en un medio complementado con al menos dos componentes seleccionados de calcio, cinc y nicotinamida (vitamina B3). Aún en otra realización, el medio de cultivo está complementado con calcio, cinc y nicotinamida (vitamina B3). En determinadas realizaciones, el medio de cultivo usado para la expresión de una proteína ADAMTS puede comprender un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente.

En un aspecto, se proporcionan procedimientos para la producción de una proteína ADAMTS. En una realización, los procedimientos comprenden las etapas de cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS en un medio de cultivo complementado con al menos uno de cinc, calcio y nicotinamida; retirar una fracción del sobrenadante del cultivo; realizar una etapa de centrifugación o de filtración para retirar cualquier célula residual; realizar una etapa de ultrafiltración para concentrar la proteína ADAMTS; y realizar una etapa de diafiltración con un tampón que comprende al menos calcio o cinc. En algunas realizaciones, la concentración de calcio puede ser de al menos aproximadamente 0,1 mM, 0,3 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 3 mM, 5 mM o más de 5 mM. En otras realizaciones, la concentración de cinc puede ser de al menos aproximadamente 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 3 µM, 5 µM, 10 µM o más de 10 µM. En una realización determinada, el sobrenadante libre de células de recogida o el tampón de diafiltración contiene combinaciones de calcio y cinc en las concentraciones mencionadas anteriormente. En una realización determinada, el punto de corte de las membranas de ultra y/o diafiltración puede ser por ejemplo de aproximadamente 150 kD o 125 kD o 100 kD o 75 kD o 50 kD o 30 kD o 10 kD o menos de 10 kD. En una realización determinada, la proteína ADAMTS es ADAMTS13 o un derivado biológicamente activo de la misma. En una realización específica, la proteína ADAMTS13 es una proteína ADAMTS13 humana o derivado biológicamente activo de la misma. En determinadas realizaciones, el medio de cultivo usado en el procedimiento puede ser un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente.

En una realización, el procedimiento comprende además una etapa de purificación seleccionada del grupo que consiste en cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de afinidad y cromatografía de interacción hidrófoba.

Aún en otra realización, puede proporcionarse complementación con cinc mediante la adición de una preparación de proteínas o polipéptidos que contiene cinc. Por ejemplo, las preparaciones típicas de insulina contienen cinc a concentraciones de manera que la complementación del medio con entre aproximadamente 1 mg/l y aproximadamente 10 mg/l de insulina también daría como resultado la complementación con cinc de aproximadamente 0,03 µM a aproximadamente 1,5 µM, tal como se calcula a partir de la monografía detallada para Novolin N InnoLet SubQ, insulina humana recombinante, que puede encontrarse en el servidor de Medscape. Por consiguiente, en una realización, el medio de cultivo usado para la expresión de una proteína ADAMTS puede complementarse con una preparación de insulina que contiene cinc.

El medio basal, que está complementado con cinc, calcio y/o nicotinamida (vitamina B3) tal como se da a conocer en el presente documento, elegido para cultivar la línea celular huésped no es crítico para la presente invención y puede ser cualquiera de, o una combinación de, los conocidos en la técnica que son adecuados para cultivar células de mamífero. Un medio tal como medio Eagle modificado por Dulbecco, medio F-12 de Ham, medio esencial mínimo de Eagle y medio RPMI-1640 y similares están disponibles comercialmente. La adición de factores de crecimiento como insulina recombinante es opcional.

En una realización, el medio basal usado para cultivar una célula que expresa una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) puede comprender una mezcla de uno o más medios definidos químicamente disponibles comercialmente, por ejemplo, medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y medio F-12 de Ham, que se ha complementado con uno o más componentes distintos de cinc, calcio y nicotinamida (vitamina B3). Los ejemplos no limitativos de componentes que pueden usarse para complementar un medio disponible comercialmente incluyen, aminoácidos esenciales (por ejemplo, glutamina), tensioactivos no iónicos (por ejemplo, Synperonic), aminos primarias (por ejemplo, etanolamina), poliaminas (por ejemplo, putrescina), metales traza (por ejemplo, hierro) y agentes tampón (por ejemplo, bicarbonato de sodio). En una realización específica, el medio es un medio BCS tal como se proporciona en la tabla 1. En otra realización específica, el medio es un medio BACD, por ejemplo, medio BACD-A13.

Tabla 1. Composición de medio de cultivo celular BCS.

Componente	Concentración [g/kg]
DMEM/F12 de HAM	11,75
L-glutamina	0,9
Synperonic	1,00
Etanolamina	0,00153

Componente	Concentración [g/kg]
Putrescina.2HCl	0,0036
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0006
NaHCO ₃	2,0

Históricamente, las células animales se han cultivado en medios que contienen suero animal. Sin embargo, tales medios están definidos de manera incompleta y conllevan el riesgo de infección. Por tanto, los expertos en la técnica han ideado medios "libres de proteínas" que o bien están completamente libres de cualquier proteína o bien al menos están libres de cualquier proteína que no se produzca de manera recombinante. La albúmina sérica humana se usa habitualmente como un complemento de cultivo libre de suero para la producción de proteínas recombinantes. Los medios preferentes incluyen los dados a conocer en las patentes estadounidenses números 6.171.825 y 6.936.441, documento WO 2007/077217 y publicaciones de solicitud de patente estadounidense números 2008/0009040 y 2007/0212770.

Opcionalmente, puede añadirse al medio un agente tensioactivo no iónico como agente desespumante, tal como propilenglicol (por ejemplo Pluronic® F-61, Pluronic® F-68, Pluronic® F-71, Pluronic® F-108 o Synperonic®). Este agente se aplica generalmente para proteger las células de los efectos negativos de la aireación ("burbujeo"). La cantidad de agente tensioactivo no iónico puede oscilar entre 0,05 y 10 g/l, preferentemente entre 0,1 y 5 g/l.

El medio del documento US 6 936 441 es particularmente muy adecuado para el cultivo de células CHO pero puede usarse también con otras células. Un medio adecuado adicional es el medio libre de oligopéptidos dado a conocer en la solicitud de patente estadounidense n.º 2007/0212770 (Baxter International Inc., Baxter Healthcare S.A.).

Tabla 2. Concentraciones a modo de ejemplo de concentración de cinc, calcio y nicotinamida (vitamina B3) que pueden usarse para complementar medios de cultivo útiles para la expresión de una proteína ADAMTS.

Cinc al menos 2 µM	Var. 1	Calcio al menos 0,5 mM	Var. 2	Nicotinamida al menos 2 mg/l	Var. 3
Cinc al menos 5 µM	Var. 4	Calcio al menos 1,5 mM	Var. 5	Nicotinamida al menos 7 mg/l	Var. 6
Cinc entre 2 y 12 µM	Var. 7	Calcio entre 0,5 y 1,5 mM	Var. 8	Nicotinamida entre 2 y 7 mg/l	Var. 9
Cinc entre 5 µM y 12 µM	Var. 10	Calcio 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	Var. 11	Nicotinamida al menos 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 más	Var. 12
Cinc al menos 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	Var. 13				

*Var. = Variación

En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteínasa con motivos de trombospondina (ADAMTS), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS en un medio de cultivo que comprende al menos uno de cinc a una concentración de al menos aproximadamente 2 µM o calcio a una concentración de al menos aproximadamente 0,5 mM. En una realización, la proteína ADAMTS es ADAMTS 1. En otra realización, la proteína ADAMTS es ADAMTS2. En otra realización, la proteína ADAMTS es ADAMTS3. En otra realización, la proteína ADAMTS es ADAMTS4. En otra realización, la proteína ADAMTS es ADAMTS5. En otra realización, la proteína ADAMTS es ADAMTS6. En otra realización, la proteína ADAMTS es ADAMTS7. En otra realización, la proteína ADAMTS es ADAMTS8. En otra realización, la proteína ADAMTS es ADAMTS9. En otra realización, la proteína ADAMTS es ADAMTS10. En otra realización, la proteína ADAMTS es ADAMTS 11. En otra realización, la proteína ADAMTS es ADAMTS12. En otra realización, la proteína ADAMTS es ADAMTS13. En otra realización, la proteína ADAMTS es ADAMTS14. En otra realización, la proteína ADAMTS es ADAMTS15. En otra realización, la proteína ADAMTS es ADAMTS16. En otra realización, la proteína ADAMTS es ADAMTS 17. En otra realización, la proteína ADAMTS es ADAMTS 18. En otra realización, la proteína ADAMTS es ADAMTS 19. En otra realización, la proteína ADAMTS es ADAMTS20. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En una realización, el medio de cultivo contiene cinc al menos aproximadamente 2 µM. En otra realización, el medio

- de cultivo contiene cinc entre aproximadamente 2 μM y aproximadamente 12 μM . Aún en otra realización, el medio de cultivo contiene cinc al menos aproximadamente 5 μM . En una realización, el medio de cultivo contiene cinc entre aproximadamente 5 μM y aproximadamente 12 μM . En otra realización, el medio de cultivo contiene calcio al menos aproximadamente 0,5 mM. Aún en otra realización, el medio de cultivo contiene calcio entre aproximadamente 0,5 mM y aproximadamente 1,5 mM. En una realización, el medio de cultivo contiene cinc al menos aproximadamente 2 μM y calcio al menos aproximadamente 0,5 mM.
- Aún en otras realizaciones, se ha encontrado que la adición de nicotinamida (vitamina B3) potencia adicionalmente la expresión y la actividad específica de proteínas ADAMTS en cultivo celular. En una realización, el medio de cultivo comprende además nicotinamida al menos aproximadamente 2 mg/l (vitamina B3). En otra realización, el medio de cultivo comprende además nicotinamida al menos aproximadamente 7 mg/l (vitamina B3). Aún en otra realización, el medio de cultivo contiene nicotinamida (vitamina B3) entre aproximadamente 2 mg/l y aproximadamente 10 mg/l.
- En determinadas realizaciones, el medio de cultivo es un medio de cultivo libre de proteínas animales. En otra realización, el medio de cultivo es un medio definido químicamente. En determinadas realizaciones, el medio de cultivo puede comprender una o más poliaminas. En una realización particular, la poliamina es putrescina, por ejemplo, a una concentración de al menos 0,5 mg/l. En una realización específica, el medio de cultivo contiene putrescina entre aproximadamente 2 mg/l y aproximadamente 8 mg/l.
- En determinadas realizaciones, la célula o línea celular usada en el cultivo es una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula de insecto, una célula de ave o una célula de mamífero. En una realización específica, la línea celular es una línea celular humana, una línea celular de hámster o una línea celular murina. En una realización más específica, la línea celular es una línea celular CHO, BHK o HEK. En una realización preferente, la línea celular es una línea celular CHO.
- En determinadas realizaciones, el ácido nucleico que codifica la proteína ADAMTS comprende una secuencia de control unida operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína ADAMTS. En una realización, la secuencia de control es un promotor. En determinadas realizaciones, el promotor es un promotor constitutivo. En otras realizaciones, el promotor es un promotor inducible.
- En determinadas realizaciones, los procedimientos proporcionados en el presente documento comprenden el uso de un sistema de cultivo celular continuo (es decir, cultivo celular continuo). En una realización, el sistema de cultivo continuo es un sistema de cultivo en quimiostato (es decir, cultivo celular en quimiostato). En otra realización, el sistema de cultivo continuo es un sistema de cultivo en turbidostato (es decir, cultivo celular en turbidostato). Aún en otra realización, el sistema de cultivo continuo es un sistema de cultivo en perfusión (es decir, cultivo celular en perfusión). En determinadas realizaciones, el sistema de cultivo continuo puede hacerse funcionar en un modo de suspensión. En otras realizaciones, el sistema de cultivo continuo puede hacerse funcionar en un modo adherente. En determinadas realizaciones, el modo adherente comprende el uso de un microportador, por ejemplo, un microportador poroso.
- En determinadas realizaciones, los procedimientos proporcionados en el presente documento comprenden el uso de un sistema de cultivo celular discontinuo (es decir, cultivo celular discontinuo). En una realización, el sistema de cultivo discontinuo es un sistema de cultivo de un único lote (es decir, cultivo celular de un único lote). En otra realización, el sistema de cultivo discontinuo es un sistema de cultivo semicontinuo (es decir, cultivo celular semicontinuo). Aún en otra realización, el sistema de cultivo discontinuo es un sistema de cultivo de lotes repetidos (es decir, cultivo celular de lotes repetidos). En determinadas realizaciones, el sistema de cultivo discontinuo puede hacerse funcionar en un modo en suspensión. En otras realizaciones, el sistema de cultivo discontinuo puede hacerse funcionar en un modo adherente. En determinadas realizaciones, el modo adherente comprende el uso de un microportador, por ejemplo, un microportador poroso.
- En determinadas realizaciones, el cultivo se mantendrá a una temperatura de entre aproximadamente 35 °C y aproximadamente 37 °C. En otras realizaciones, el cultivo se mantendrá a un pH de entre aproximadamente 6,9 y aproximadamente 7,3. En una realización específica, el cultivo se mantendrá a un pH de entre aproximadamente 7,05 y aproximadamente 7,15.
- En determinadas realizaciones, los procedimientos proporcionados en el presente documento producirán proteínas ADAMTS13 en el medio de cultivo (es decir, ADAMTS13 expresada) con actividades específicas de al menos 600 U por mg de proteína ADAMTS13. En otras realizaciones, la actividad específica será de al menos 800U por mg de proteína ADAMTS13. En otras realizaciones, la actividad específica será de al menos 1000 U por mg de proteína ADAMTS13. En otras realizaciones, la actividad específica será de al menos 1500 U por mg de proteína ADAMTS13. En otras realizaciones, la actividad específica será de al menos 2000 U por mg de proteína ADAMTS13.
- En otras realizaciones, los procedimientos proporcionan cultivos que producen al menos 400 U de actividad de ADAMTS13 por l de cultivo al día (U/l/d). En una realización, los procedimientos proporcionan cultivos que producen al menos 800 U de actividad de ADAMTS13 por l de cultivo al día (U/l/d).

A. ADAMTS13

5 En un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para expresar una proteína ADAMTS13 que tiene actividad total y/o específica aumentada. Ventajosamente, se encontró que complementando un medio de crecimiento con calcio, cinc y/o nicotinamida (vitamina B3), podían expresarse de manera recombinante y recuperarse del cultivo celular polipéptidos ADAMTS13 que tenían actividad específica alta.

10 En el documento WO 2009/086309 se facilitan procedimientos para la expresión de ADAMTS13. Esta referencia describe procedimientos y condiciones de cultivo adecuados, que pueden mantenerse durante toda la duración del cultivo. Tal como se describe en el presente documento, los cultivos celulares usados para la expresión de proteínas ADAMTS13 generalmente se mantendrán a una temperatura a o aproximadamente a entre 34 °C y 37 °C y un pH a o aproximadamente a entre 6,8 y 7,3.

15 Se conocen bien en esta técnica maneras de monitorizar la temperatura y el pH del cultivo y generalmente se basan en sondas que se insertan en el biorreactor, o se incluyen en asas a través de las cuales se hace circular el medio de cultivo, o se insertan en muestras extraídas de medio de cultivo. Los sensores de pH en línea adecuados incluyen el sensor InPro 3100/125/Pt100 de Mettler Toledo (Mettler-Toledo Ingold, Inc., Bedford, MA). También se conocen bien maneras de alterar el parámetro especificado con el fin de mantenerlo al nivel predefinido. Por ejemplo, mantener la temperatura constante habitualmente implica calentar o enfriar el biorreactor o el medio de alimentación (si es un proceso semicontinuo o continuo); mantener el pH constante habitualmente implica elegir y suministrar una cantidad suficiente de un tampón apropiado (normalmente bicarbonato) y añadir al medio de alimentación ácido, tal como ácido clorhídrico, o álcali, tal como hidróxido de sodio, bicarbonato de sodio o una mezcla de los mismos, según sea necesario. Es posible que la calibración de una sonda de pH en línea pueda desviarse a lo largo del tiempo, tal como a lo largo de periodos de días o semanas, durante los que se cultivan las células. En ese caso, puede ser beneficioso reajustar la sonda en línea usando las mediciones obtenidas a partir de una sonda fuera de línea calibrada recientemente.

30 En una realización, los procedimientos comprenden cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en medio de cultivo complementado con al menos un componente seleccionado de calcio, cinc y nicotinamida (vitamina B3). En una realización específica, una proteína ADAMTS se expresa en un medio complementado con al menos dos componentes seleccionados de calcio, cinc y nicotinamida (vitamina B3). Aún en otra realización, el medio de cultivo está complementado con calcio, cinc y nicotinamida (vitamina B3). En algunas realizaciones, el medio de cultivo puede ser un medio de cultivo libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente.

1. Complementación con zinc

40 Ventajosamente, se encontró que la actividad enzimática y la actividad específica aumentadas de ADAMTS13 podían recuperarse a partir de un cultivo celular cultivado en un medio complementado con cinc. Por ejemplo, el ejemplo 1, demuestra que la proteína ADAMTS13 expresada en medio de cultivo que contiene 1,432 mg/l de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (cinc 5 μM) tiene una actividad específica superior del 40 % al 100 % que la proteína ADAMTS13 expresada en medio de cultivo que contiene sólo 0,432 mg/l de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (cinc 1,5 μM) (compárese, la tabla 10 y la tabla 11). Además, este efecto es reproducible, tal como se muestra en el ejemplo 2 (compárese, la tabla 13 y la tabla 14); el ejemplo 4 (tabla 16 a tabla 19); y el ejemplo 5 (tabla 20 y tabla 21).

50 Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para expresar una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que tiene una actividad aumentada específica cultivando una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un medio de cultivo complementado con cinc, por ejemplo, que contiene cinc al menos 2 μM . De manera similar, la presente invención también proporciona procedimientos para preparar una composición de proteína (por ejemplo, una composición de ADAMTS13) que tiene actividad total o actividad específica aumentada cultivando una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un medio de cultivo complementado con cinc, por ejemplo, que contiene cinc al menos 2 μM .

55 En una realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteinasas con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende cinc al menos o aproximadamente 2 μM . En otra realización, el procedimiento comprende cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende cinc al menos o aproximadamente 5 μM . En una realización, el medio de cultivo contiene cinc a o aproximadamente a entre 2 μM y 12 μM . En otra realización, el medio de cultivo contiene cinc a o aproximadamente a entre 5 μM y 12 μM . Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo puede contener cinc al menos o aproximadamente 2 μM , o al menos o aproximadamente 3 μM , 4 μM , 5 μM , 6 μM , 7 μM , 8 μM , 9 μM , 10 μM , 11 μM , 12 μM , en determinados aspectos comparativos 13 μM , 14 μM , 15 μM , 20 μM , 25 μM , 30 μM o más. Los intervalos de concentración de cinc

adecuados se determinan generalmente por las toxicidades del cultivo celular que pueden producirse en presencia de altas concentraciones de cinc, por ejemplo, a concentraciones mayores de 20 μM , 25 μM , 30 μM , 40 μM y similares. Tal como entenderá el experto en la técnica, el grado en que las concentraciones de cinc son inhibitoras para un sistema de cultivo particular será altamente dependiente de, entre otros factores, el tipo de célula usada para expresar una proteína ADAMTS, los componentes del medio de cultivo utilizado y el modo de funcionamiento empleado para el cultivo (por ejemplo, discontinuo frente a continuo; suspensión frente a adherente; quimiostato frente a perfusión; etc.). En determinados casos, pueden requerirse concentraciones superiores de cinc cuando los componentes del medio de cultivo pueden secuestrar cinc de la solución, por ejemplo, en casos en los que el medio de cultivo contiene albúmina. Por consiguiente, los intervalos de concentración de cinc adecuados se determinan generalmente por la identidad de las células cultivadas, el medio y el modo de funcionamiento empleados. Un experto podrá determinar fácilmente los límites superiores apropiados para el uso de complementación con cinc basándose en el sistema de cultivo individual empleado.

En una realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteínasa con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), que comprende cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales que contiene cinc al menos o aproximadamente 2 μM . En otra realización, el procedimiento comprende cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales que comprende cinc al menos o aproximadamente 5 μM . En una realización, el medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales contiene cinc a o aproximadamente a entre 2 μM y 12 μM . En otra realización, el medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales contiene cinc a o aproximadamente a entre 5 μM y 12 μM . Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales puede contener cinc al menos o aproximadamente 2 μM , o al menos o aproximadamente 3 μM , 4 μM , 5 μM , 6 μM , 7 μM , 8 μM , 9 μM , 10 μM , 11 μM , 12 μM , en determinados aspectos comparativos 13 μM , 14 μM , 15 μM , 20 μM , 25 μM , 30 μM o más. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.

En otra realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteínasa con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), que comprende cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo definido químicamente que contiene cinc al menos o aproximadamente 2 μM . En otra realización, el procedimiento comprende cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo definido químicamente que comprende cinc al menos o aproximadamente 5 μM . En una realización, el medio de cultivo definido químicamente contiene cinc a o aproximadamente a entre 2 μM y 12 μM . En otra realización, el medio de cultivo definido químicamente contiene cinc a o aproximadamente a entre 5 μM y 12 μM . Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales puede contener cinc al menos o aproximadamente 2 μM , o al menos o aproximadamente 3 μM , 4 μM , 5 μM , 6 μM , 7 μM , 8 μM , 9 μM , 10 μM , 11 μM , 12 μM , en determinados aspectos comparativos 13 μM , 14 μM , 15 μM , 20 μM , 25 μM , 30 μM o más. En determinadas realizaciones, el medio definido químicamente estará libre de proteínas y/o polipéptidos derivados de animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.

En una realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteínasa con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende cinc al menos o aproximadamente 2 μM . En otra realización, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende cinc al menos o aproximadamente 5 μM . En una realización, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende cinc a o aproximadamente a entre 2 μM y 12 μM . En otra realización, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende cinc a o aproximadamente a entre 5 μM y 12 μM . Aún en otras realizaciones, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende cinc al menos o aproximadamente 2 μM , o al menos aproximadamente 3 μM , 4 μM , 5 μM , 6 μM , 7 μM , 8 μM , 9 μM , 10 μM , 11 μM , 12 μM , en determinados aspectos comparativos 13 μM , 14 μM , 15 μM , 20 μM , 25 μM , 30 μM o más. En realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la

poliamina es putrescina.

En una realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteinasas con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende cinc al menos o aproximadamente 2 μM , en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En otra realización, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende cinc al menos o aproximadamente 5 μM , en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En una realización, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende cinc a o aproximadamente a entre 2 μM y 12 μM , en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En otra realización, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende cinc a o aproximadamente a entre 5 μM y 12 μM , en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. Aún en otras realizaciones, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende cinc al menos o aproximadamente 2 μM , o al menos o aproximadamente 3 μM , 4 μM , 5 μM , 6 μM , 7 μM , 8 μM , 9 μM , 10 μM , 11 μM , 12 μM , en determinados aspectos comparativos 13 μM , 14 μM , 15 μM , 20 μM , 25 μM , 30 μM o más, en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En una realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo quimiostático. En otra realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo en perfusión. En una realización, la célula que alberga el ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 es una célula de mamífero. En realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.

En otra realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteinasas con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende cinc al menos o aproximadamente 2 μM , en el que el cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En otra realización, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende cinc al menos o aproximadamente 5 μM , en el que el cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En una realización, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende cinc a o aproximadamente a entre 2 μM y 12 μM , en el que el cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En otra realización, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende cinc a o aproximadamente a entre 5 μM y 12 μM , en el que el cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. Aún en otras realizaciones, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende cinc al menos o aproximadamente 2 μM , o al menos o aproximadamente 3 μM , 4 μM , 5 μM , 6 μM , 7 μM , 8 μM , 9 μM , 10 μM , 11 μM , 12 μM , en determinados aspectos comparativos 13 μM , 14 μM , 15 μM , 20 μM , 25 μM , 30 μM o más, en el que el cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En una realización específica, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a 36 °C. En una realización, la temperatura del cultivo se mantiene durante al menos 7 días. En una realización, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En una realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo quimiostático. En otra realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo en perfusión. En una realización, la célula que alberga el ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 es una célula de mamífero. En realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.

En otra realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteinasas con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende cinc al menos o aproximadamente 2 μM , en el que el pH del cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 6,9 y 7,3. En otra realización, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende cinc al menos o aproximadamente 5 μM , en el que el pH del cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 6,9 y 7,3. En una realización, el procedimiento

comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende cinc a o aproximadamente a entre 2 μM y 12 μM , en el que el pH del cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 6,9 y 7,3. En otra realización, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende cinc a o aproximadamente a entre 5 μM y 12 μM , en el que el pH del cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 6,9 y 7,3. Aún en otras realizaciones, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende cinc al menos o aproximadamente 2 μM , o al menos o aproximadamente 3 μM , 4 μM , 5 μM , 6 μM , 7 μM , 8 μM , 9 μM , 10 μM , 11 μM , 12 μM , en determinados aspectos comparativos 13 μM , 14 μM , 15 μM , 20 μM , 25 μM , 30 μM o más, en el que el pH del cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 6,9 y 7,3. En una realización, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En una realización específica, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a 36 °C. En una realización, la temperatura y/o el pH del cultivo se mantienen durante al menos 7 días. En una realización, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En una realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo quimiostático. En otra realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo en perfusión. En una realización, la célula que alberga el ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 es una célula de mamífero. En realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.

En una realización, el medio de cultivo usado para la expresión de una proteína ADAMTS puede complementarse con cinc a una concentración final de al menos aproximadamente 2 μM a al menos aproximadamente 1 μM . En determinadas realizaciones, el medio de cultivo puede complementarse con cinc a una concentración final de al menos aproximadamente 2 μM , o al menos aproximadamente 3 μM , 4 μM , 5 μM , 6 μM , 7 μM , 8 μM , 9 μM , 10 μM , 11 μM , 12 μM , en determinados aspectos comparativos 13 μM , 14 μM , 15 μM , 20 μM , 25 μM , 30 μM o niveles superiores de cinc. Generalmente, puede usarse cualquier sal de cinc para complementar los medios de la invención, incluyendo 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 de la invención.

2. Complementación con calcio

Ventajosamente, se encontró que la actividad enzimática y la actividad específica aumentadas de ADAMTS13 podían recuperarse a partir de un cultivo celular cultivado en un medio complementado con calcio. Los medios de cultivo celular tradicionales, por ejemplo, DMEM/F12, normalmente contenían calcio aproximadamente 1 mM. Históricamente, estos niveles altos de calcio se introdujeron en el medio para ayudar con los cultivos celulares adherentes. Sin embargo, en la actualidad, los medios disponibles comercialmente diseñados para cultivos en suspensión contienen significativamente niveles de calcio inferiores, por ejemplo, calcio aproximadamente 0,1 mM. Tales niveles de calcio inferiores se basan en impedir la agregación de células cultivadas a través de procedimientos de suspensión. Se sabe que niveles de calcio inferiores son suficientes para propagar células en suspensión y expresar proteínas recombinantes, sin embargo, los inventores han encontrado que estos bajos niveles de calcio son insuficientes para la expresión de las proteínas ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13).

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para expresar una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que tiene una actividad específica aumentada cultivando una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un medio de cultivo complementado con calcio, por ejemplo, que contiene calcio al menos 0,5 mM. De manera similar, la presente invención también proporciona procedimientos para preparar una composición de proteína ADAMTS (por ejemplo, una composición de ADAMTS13) que tiene actividad total o actividad específica aumentada cultivando una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un medio de cultivo complementado con calcio, por ejemplo, que contiene calcio al menos 0,5 mM.

En una realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteinasas con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM. En otra realización, el procedimiento comprende cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende calcio al menos o aproximadamente 1,5 mM. En una realización, el medio de cultivo contiene calcio a o aproximadamente a entre 0,5 mM y 1,5 mM. Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo puede contener calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM, o al menos o aproximadamente 0,6 mM, 0,7 mM, 0,8 mM, 0,9 mM, 1,0 mM, 1,1 M,

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.

5 En una realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteinasas con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), que comprende cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales que contiene calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM. En otra realización, el procedimiento comprende cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales que comprende calcio al menos o aproximadamente 1,5 mM. En una realización, el medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales contiene calcio a o aproximadamente a entre 0,5 mM y 1,5 mM. Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales puede contener calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM, o al menos 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 comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.

20 En otra realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteinasas con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), que comprende cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo definido químicamente que contiene calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM. En otra realización, el procedimiento comprende cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo definido químicamente que comprende calcio al menos o aproximadamente 1,5 mM. En una realización, el medio de cultivo definido químicamente contiene calcio a o aproximadamente a entre 0,5 mM y 1,5 mM. Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales puede contener calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM, o al menos 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 determinadas realizaciones, el medio definido químicamente estará libre de proteínas y/o polipéptidos derivados de animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.

35 En una realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteinasas con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM. En otra realización, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende calcio al menos o aproximadamente 1,5 mM. En una realización, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende calcio a o aproximadamente a entre 0,5 mM y 1,5 mM. Aún en otras realizaciones, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM, o al menos 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 realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.

55 En una realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteinasas con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM, en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En otra realización, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende calcio al menos o aproximadamente 1,5 mM, en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En una realización, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende calcio a o aproximadamente a entre 0,5 mM y 1,5 mM, en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. Aún en otras realizaciones, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM, o al menos 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 condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En una realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo quimiostático. En otra realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo en perfusión. En una realización, la célula que alberga el ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 es una célula de mamífero. En realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.

En otra realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteinasas con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM, en el que el cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En otra realización, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende calcio al menos o aproximadamente 1,5 mM, en el que el cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En una realización, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende calcio a o aproximadamente a entre 0,5 mM y 1,5 mM, en el que el cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. Aún en otras realizaciones, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM, o al menos 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 el que el cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En una realización específica, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a 36 °C. En una realización, la temperatura del cultivo se mantiene durante al menos 7 días. En una realización, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En una realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo quimiostático. En otra realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo en perfusión. En una realización, la célula que alberga el ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 es una célula de mamífero. En realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.

En otra realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteinasas con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM, en el que el pH del cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 6,9 y 7,3. En otra realización, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende calcio al menos o aproximadamente 1,5 mM, en el que el pH del cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 6,9 y 7,3. En una realización, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende calcio a o aproximadamente a entre 0,5 mM y 1,5 mM, en el que el pH del cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 6,9 y 7,3. Aún en otras realizaciones, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM, o al menos 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 el que el pH del cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 6,9 y 7,3. En una realización, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En una realización específica, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a 36 °C. En una realización, la temperatura y/o el pH del cultivo se mantienen durante al menos 7 días. En una realización, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En una realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo quimiostático. En otra realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo en perfusión. En una realización, la célula que alberga el ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 es una célula de mamífero. En realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l.

En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.

5 En otra realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteínasa con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM y cinc al menos o aproximadamente 2 μ M. En una realización relacionada, el medio de cultivo comprende calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM y cinc al menos o aproximadamente 5 μ M. En otra realización relacionada, el medio de cultivo comprende calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM y al menos o aproximadamente entre cinc 2 μ M y cinc 12 μ M. Aún en otra realización relacionada, el medio de cultivo comprende calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM y al menos o aproximadamente entre cinc 5 μ M y cinc 12 μ M. En determinadas realizaciones, el medio de cultivo comprende calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM y cinc al menos o aproximadamente 2 μ M, o al menos o aproximadamente 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 6 μ M, 7 μ M, 8 μ M, 9 μ M, 10 μ M, 11 μ M, 12 μ M, en determinados aspectos comparativos 13 μ M, 14 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M, 30 μ M o más. 10 En una realización, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En una realización específica, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a 36 °C. En una realización, la temperatura y/o el pH del cultivo se mantienen durante al menos 7 días. En una realización, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En una realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo quimiostático. En otra realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo en perfusión. En una realización, la célula que alberga el ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 es una célula de mamífero. En realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.

30 En otra realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteínasa con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende calcio al menos o aproximadamente 1,5 mM y cinc al menos o aproximadamente 2 μ M. En una realización relacionada, el medio de cultivo comprende calcio al menos o aproximadamente 1,5 mM y cinc al menos o aproximadamente 5 μ M. En otra realización relacionada, el medio de cultivo comprende calcio al menos o aproximadamente 1,5 mM y al menos o aproximadamente entre cinc 2 μ M y cinc 12 μ M. Aún en otra realización relacionada, el medio de cultivo comprende calcio al menos o aproximadamente 1,5 mM y al menos o aproximadamente entre cinc 5 μ M y cinc 12 μ M. En determinadas realizaciones, el medio de cultivo comprende calcio al menos o aproximadamente 1,5 mM y cinc al menos o aproximadamente 2 μ M, o al menos o aproximadamente 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 6 μ M, 7 μ M, 8 μ M, 9 μ M, 10 μ M, 11 μ M, 12 μ M, en determinados aspectos comparativos 13 μ M, 14 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M, 30 μ M o más. 35 En una realización, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En una realización específica, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a 36 °C. En una realización, la temperatura y/o el pH del cultivo se mantienen durante al menos 7 días. En una realización, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En una realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo quimiostático. En otra realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo en perfusión. En una realización, la célula que alberga el ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 es una célula de mamífero. En realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.

55 En otra realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteínasa con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende calcio al menos o aproximadamente entre 0,5 mM y 1,5 mM y cinc al menos o aproximadamente 2 μ M. En una realización relacionada, el medio de cultivo comprende calcio al menos o aproximadamente entre 0,5 mM y 1,5 mM y cinc al menos o aproximadamente 5 μ M. En otra realización relacionada, el medio de cultivo comprende calcio al menos o aproximadamente entre 0,5 mM y 1,5 mM y al menos o aproximadamente entre cinc 2 μ M y cinc 12 μ M. Aún en otra realización relacionada, el medio de cultivo comprende calcio al menos o aproximadamente entre 0,5 mM y 1,5 mM y al menos o aproximadamente entre cinc 5 μ M y cinc 12 μ M. En determinadas realizaciones, el medio de cultivo comprende calcio al menos o aproximadamente entre 0,5 mM y 1,5 mM y cinc al menos o aproximadamente 2 μ M, o 60 65

al menos o aproximadamente 3 μM , 4 μM , 5 μM , 6 μM , 7 μM , 8 μM , 9 μM , 10 μM , 11 μM , 12 μM , en determinados aspectos comparativos 13 μM , 14 μM , 15 μM , 20 μM , 25 μM , 30 μM o más. En una realización, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En una realización específica, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a 36 °C. En una realización, la temperatura y/o el pH del cultivo se mantienen durante al menos 7 días. En una realización, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En una realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo quimiostático. En otra realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo en perfusión. En una realización, la célula que alberga el ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 es una célula de mamífero. En realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.

En otra realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteinasas con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM, o al menos 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 y cinc al menos o aproximadamente 2 μM . En una realización relacionada, el medio de cultivo comprende calcio a o aproximadamente a 0,5 mM, o al menos 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 y cinc al menos o aproximadamente 5 μM . En otra realización relacionada, el medio de cultivo comprende calcio a o aproximadamente a 0,5 mM, o al menos 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 y al menos o aproximadamente entre cinc 2 μM y cinc 12 μM . Aún en otra realización relacionada, el medio de cultivo comprende calcio a o aproximadamente a 0,5 mM, o al menos 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 y al menos o aproximadamente entre cinc 5 μM y cinc 12 μM . En determinadas realizaciones, el medio de cultivo comprende calcio a o aproximadamente a 0,5 mM, o al menos 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 y cinc al menos o aproximadamente 2 μM , o al menos o aproximadamente 3 μM , 4 μM , 5 μM , 6 μM , 7 μM , 8 μM , 9 μM , 10 μM , 11 μM , 12 μM , en determinados aspectos comparativos 13 μM , 14 μM , 15 μM , 20 μM , 25 μM , 30 μM o más. En una realización, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En una realización específica, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a 36 °C. En una realización, la temperatura y/o el pH del cultivo se mantienen durante al menos 7 días. En una realización, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En una realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo quimiostático. En otra realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo en perfusión. En una realización, la célula que alberga el ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 es una célula de mamífero. En realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.

Generalmente, puede usarse cualquier sal de calcio para complementar los medios de la invención. Los ejemplos no limitativos de sales aceptables incluyen CaCl_2 , CaCl_2 , $\text{CaFPO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CaI_2 , CaBr_2 , $(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2\text{Ca}$, $(\text{CHO}_2)_2\text{Ca}$, $(\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6)_2\text{Ca}$, $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, y similares. En determinadas realizaciones, se usa una sal de calcio farmacéuticamente aceptable para complementar los medios de cultivo de la invención.

3. Complementación con nicotinamida (vitamina B3)

Ventajosamente, se encontró que la actividad enzimática y la actividad específica aumentadas de ADAMTS13 podían recuperarse a partir de un cultivo celular cultivado en un medio complementado con nicotinamida (vitamina B3). Por ejemplo, en el ejemplo 2 se demuestra que la proteína ADAMTS13 expresada en medio de cultivo que contiene nicotinamida (vitamina B3) 7 mg/l tiene una actividad específica superior en un 60 % que la proteína ADAMTS13 expresada en medio de cultivo que contiene sólo nicotinamida 2 mg/l (tabla 13; compárense los días 4 y 7 con el día 11). Sorprendentemente, este efecto es sinérgico con la complementación con cinc, ya que la expresión de ADAMTS13 en medio que contiene nicotinamida (vitamina B3) 7 mg/l y cinc 5 μM da como resultado un aumento

del 200 % al 300 % en la actividad específica de la proteína ADAMTS13 (compárese la tabla 14 día 11 con la tabla 13 días 4 y 7).

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para expresar una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que tiene una actividad específica aumentada cultivando una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un medio de cultivo complementado con nicotinamida (vitamina B3), por ejemplo, que contiene nicotinamida (vitamina B3) al menos 2 mg/l. De manera similar, la presente invención también proporciona procedimientos para preparar una composición de proteína ADAMTS (por ejemplo, una composición de ADAMTS13) que tiene actividad total o actividad específica aumentada cultivando una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un medio de cultivo complementado con nicotinamida (vitamina B3), por ejemplo, que contiene nicotinamida (vitamina B3) al menos 2 mg/l.

En una realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteinasas con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 2 mg/l. En otra realización, el procedimiento comprende cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 7 mg/l. En una realización, el medio de cultivo contiene nicotinamida (vitamina B3) a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 10 mg/l. Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo puede contener concentraciones de nicotinamida (vitamina B3) de al menos 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 superiores. Los intervalos de concentración de nicotinamida (vitamina B3) adecuados se determinan generalmente por las toxicidades del cultivo celular que pueden producirse en presencia de altas concentraciones de nicotinamida (vitamina B3), por ejemplo, a concentraciones mayores de 15 mg/l, 20 mg/l, 30 mg/l, 40 mg/l y similares. Tal como entenderá el experto en la técnica, el grado en que las concentraciones de nicotinamida (vitamina B3) son inhibitorias para un sistema de cultivo particular será altamente dependiente de, entre otros factores, el tipo de célula usada para expresar una proteína ADAMTS, los componentes del medio de cultivo utilizado, y el modo de funcionamiento empleado para el cultivo (por ejemplo, discontinuo frente a continuo; suspensión frente a adherente; quimioestato frente a perfusión; etc.). En determinados casos, pueden requerirse concentraciones de nicotinamida (vitamina B3) superiores cuando los componentes del medio de cultivo pueden secuestrar nicotinamida (vitamina B3) de la solución. Por consiguiente, los intervalos de concentración de nicotinamida (vitamina B3) adecuados se determinan generalmente por la identidad de las células cultivadas, el medio y el modo de funcionamiento empleados. Un experto podrá determinar fácilmente los límites superiores apropiados para el uso de complementación con nicotinamida (vitamina B3) basándose en el sistema de cultivo individual empleado.

En una realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteinasas con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), que comprende cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales que contiene nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 2 mg/l. En otra realización, el procedimiento comprende cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales que comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 7 mg/l. En una realización, el medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales contiene nicotinamida (vitamina B3) a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 10 mg/l. Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales puede contener al menos 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 superiores de nicotinamida (vitamina B3). En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.

En otra realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteinasas con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), que comprende cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo definido químicamente que contiene nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 2 mg/l. En otra realización, el procedimiento comprende cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo definido químicamente que comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 7 mg/l. En una realización, el medio de cultivo definido químicamente contiene nicotinamida (vitamina B3) a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 10 mg/l. Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales puede contener concentraciones de nicotinamida (vitamina B3) de al menos 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 superiores. En determinadas realizaciones, el medio definido químicamente estará libre de proteínas y/o polipéptidos derivados de animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.

En una realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteinasas

- con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 2 mg/l. En otra realización, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 7 mg/l. En una realización, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende nicotinamida (vitamina B3) a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 10 mg/l. Aún en otras realizaciones, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende concentraciones de nicotinamida (vitamina B3) de al menos 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 superiores. En realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.
- En una realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteínasa con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 2 mg/l, en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En otra realización, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 7 mg/l, en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En una realización, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende nicotinamida (vitamina B3) a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 10 mg/l, en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. Aún en otras realizaciones, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende concentraciones de nicotinamida (vitamina B3) de al menos 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 g/l, 20 mg/l o superiores, en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En una realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo quimiostático. En otra realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo en perfusión. En una realización, la célula que alberga el ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 es una célula de mamífero. En realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.
- En otra realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteínasa con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 2 mg/l, en el que el cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En otra realización, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 7 mg/l, en el que el cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En una realización, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende nicotinamida a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 10 mg/l, en el que el cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. Aún en otras realizaciones, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende concentraciones de nicotinamida al menos 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 superiores, en el que el cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En una realización específica, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a 36 °C. En una realización, la temperatura del cultivo se mantiene durante al menos 7 días. En una realización, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En una realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo quimiostático. En otra realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo en perfusión. En una realización, la célula que alberga el ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 es una célula de mamífero. En realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o

polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.

En otra realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteínasa con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 2 mg/l, en el que el pH del cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 6,9 y 7,3. En otra realización, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 7 mg/l, en el que el pH del cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 6,9 y 7,3. En una realización, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende nicotinamida (vitamina B3) a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 10 mg/l, en el que el pH del cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 6,9 y 7,3. Aún en otras realizaciones, el procedimiento comprende cultivar una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende concentraciones de nicotinamida (vitamina B3) de al menos 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 superiores, en el que el pH del cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 6,9 y 7,3. En una realización, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En una realización específica, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a 36 °C. En una realización, la temperatura y/o el pH del cultivo se mantienen durante al menos 7 días. En una realización, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En una realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo quimiostático. En otra realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo en perfusión. En una realización, la célula que alberga el ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 es una célula de mamífero. En realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.

En otra realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteínasa con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 2 mg/l y cinc al menos o aproximadamente 2 µM. En una realización relacionada, el medio de cultivo comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 2 mg/l y cinc al menos o aproximadamente 5 µM. En otra realización relacionada, el medio de cultivo comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 2 mg/l y al menos o aproximadamente entre cinc 2 µM y cinc 12 µM. Aún en otra realización relacionada, el medio de cultivo comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 2 mg/l y al menos o aproximadamente entre cinc 5 µM y cinc 12 µM. En determinadas realizaciones, el medio de cultivo comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 2 mg/l y cinc al menos o aproximadamente 2 µM, o al menos o aproximadamente 3 µM, 4 µM, 5 µM, 6 µM, 7 µM, 8 µM, 9 µM, 10 µM, 11 µM, 12 µM, en determinados aspectos comparativos 13 µM, 14 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM o más. En una realización, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En una realización específica, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a 36 °C. En una realización, la temperatura y/o el pH del cultivo se mantienen durante al menos 7 días. En una realización, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En una realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo quimiostático. En otra realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo en perfusión. En una realización, la célula que alberga el ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 es una célula de mamífero. En realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.

En otra realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteínasa con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende nicotinamida

- (vitamina B3) al menos o aproximadamente 7 mg/l y cinc al menos o aproximadamente 2 μ M. En una realización relacionada, el medio de cultivo comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 7 mg/l y cinc al menos o aproximadamente 5 μ M. En otra realización relacionada, el medio de cultivo comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 7 mg/l y al menos o aproximadamente entre cinc 2 μ M y cinc 12 μ M. Aún en otra realización relacionada, el medio de cultivo comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 7 mg/l y al menos o aproximadamente entre cinc 5 μ M y cinc 12 μ M. En determinadas realizaciones, el medio de cultivo comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 7 mg/l y cinc al menos o aproximadamente 2 μ M, o al menos o aproximadamente 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 6 μ M, 7 μ M, 8 μ M, 9 μ M, 10 μ M, 11 μ M, 12 μ M, en determinados aspectos comparativos 13 μ M, 14 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M, 30 μ M o más. En una realización, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En una realización específica, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a 36 °C. En una realización, la temperatura y/o el pH del cultivo se mantienen durante al menos 7 días. En una realización, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En una realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo quimiostático. En otra realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo en perfusión. En una realización, la célula que alberga el ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 es una célula de mamífero. En realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.
- En otra realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente entre 2 mg/l y 10 mg/l y cinc al menos o aproximadamente 2 μ M. En una realización relacionada, el medio de cultivo comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente entre 2 mg/l y 10 mg/l y cinc al menos o aproximadamente 5 μ M. En otra realización relacionada, el medio de cultivo comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente entre 2 mg/l y 10 mg/l y al menos o aproximadamente entre cinc 2 μ M y cinc 12 μ M. Aún en otra realización relacionada, el medio de cultivo comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente entre 2 mg/l y 10 mg/l y al menos o aproximadamente entre cinc 5 μ M y cinc 12 μ M. En determinadas realizaciones, el medio de cultivo comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente entre 2 mg/l y 10 mg/l y cinc al menos o aproximadamente 2 μ M, o al menos o aproximadamente 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 6 μ M, 7 μ M, 8 μ M, 9 μ M, 10 μ M, 11 μ M, 12 μ M, en determinados aspectos comparativos 13 μ M, 14 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M, 30 μ M o más. En una realización, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En una realización específica, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a 36 °C. En una realización, la temperatura y/o el pH del cultivo se mantienen durante al menos 7 días. En una realización, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En una realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo quimiostático. En otra realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo en perfusión. En una realización, la célula que alberga el ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 es una célula de mamífero. En realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.
- En otra realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende concentraciones de nicotinamida (vitamina B3) de al menos 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 superiores y cinc al menos o aproximadamente 2 μ M. En una realización relacionada, el medio de cultivo comprende concentraciones de nicotinamida (vitamina B3) a o aproximadamente a 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 superiores y cinc al menos o aproximadamente 5 μ M. En otra realización relacionada, el medio de cultivo comprende concentraciones de nicotinamida (vitamina B3) a o aproximadamente a 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 superiores y al menos o aproximadamente entre cinc 2 μ M y cinc 12 μ M. Aún en otra realización relacionada, el medio de cultivo comprende concentraciones de nicotinamida (vitamina B3) a o aproximadamente a 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 superiores y al menos o aproximadamente entre cinc 2 μ M y cinc 12 μ M. En determinadas realizaciones, el medio de cultivo comprende concentraciones de nicotinamida (vitamina B3) a o aproximadamente a 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 superiores y cinc al menos o aproximadamente 2 μ M, o al menos o aproximadamente 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 6 μ M, 7 μ M, 8 μ M, 9 μ M, 10 μ M, 11 μ M, 12 μ M, en determinados aspectos comparativos 13 μ M, 14 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M, 30 μ M o más. En una realización, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En una realización específica, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a 36 °C. En una realización, la temperatura y/o el pH del cultivo se mantienen durante al menos 7 días. En una realización, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En una realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo quimiostático. En otra realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo en perfusión. En una realización, la célula que alberga el ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 es una célula de mamífero. En realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.

En otra realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteínasa con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 2 mg/l y calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM. En una realización relacionada, el medio de cultivo comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 2 mg/l y calcio al menos o aproximadamente 1,5 mM. En otra realización relacionada, el medio de cultivo comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 2 mg/l y calcio al menos o aproximadamente entre 0,5 mM y 1,5 mM. En determinadas realizaciones, el medio de cultivo comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 2 mg/l y calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM, o al menos 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 cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En una realización específica, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a 36 °C. En una realización, la temperatura y/o el pH del cultivo se mantienen durante al menos 7 días. En una realización, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En una realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo quimiostático. En otra realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo en perfusión. En una realización, la célula que alberga el ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 es una célula de mamífero. En realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.

En otra realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteínasa con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 7 mg/l y calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM. En una realización relacionada, el medio de cultivo comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 7 mg/l y calcio al menos o aproximadamente 1,5 mM. En otra realización relacionada, el medio de cultivo comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 7 mg/l y calcio al menos o aproximadamente entre 0,5 mM y 1,5 mM. En determinadas realizaciones, el medio de cultivo comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 7 mg/l y calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM, o al menos 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 cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En una realización específica, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a 36 °C. En una realización, la temperatura y/o el pH del cultivo se mantienen durante al menos 7 días. En una realización, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En una realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo quimiostático. En otra realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo en perfusión. En una realización, la célula que alberga el ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 es una célula de mamífero. En realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.

En otra realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteínasa con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente entre 2 mg/l y 10 mg/l y calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM. En una realización relacionada, el medio de cultivo comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente entre 2 mg/l y 10 mg/l y calcio al menos o aproximadamente 1,5 mM. En otra realización relacionada, el medio de cultivo comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente entre 2 mg/l y 10 mg/l y calcio al menos o aproximadamente entre 0,5 mM y 1,5 mM. En determinadas realizaciones, el medio de cultivo comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente entre 2 mg/l y 10 mg/l y calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM, o al menos 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 cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En una realización específica, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a 36 °C. En una realización, la temperatura y/o el pH del cultivo se mantienen durante al menos 7 días. En una realización, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En una realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo quimiostático. En otra realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo en perfusión. En una realización, la célula que alberga el ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 es una célula de mamífero. En realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.

En otra realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteínasa con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende concentraciones de nicotinamida (vitamina B3) de al menos 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 superiores y calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM. En una realización relacionada, el medio de cultivo comprende concentraciones de nicotinamida (vitamina B3) a o aproximadamente a 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 superiores y calcio al menos o aproximadamente 1,5 mM. En otra realización relacionada, el medio de cultivo comprende concentraciones de nicotinamida (vitamina B3) a o aproximadamente a 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 superiores y calcio al menos o aproximadamente entre 0,5 mM y 1,5 mM. En determinadas realizaciones, el medio de cultivo comprende concentraciones de nicotinamida (vitamina B3) a o aproximadamente a 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 superiores y calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM, o al menos 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 cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En una realización específica, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a 36 °C. En una realización, la temperatura y/o el pH del cultivo se mantienen durante al menos 7 días. En una realización, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En una realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo quimiostático. En otra realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo en perfusión. En una realización, la célula que alberga el ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 es una célula de mamífero. En realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.

En una realización, se proporciona un procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteínasa con motivos de trombospondina 13 (ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo que comprende cinc, calcio y nicotinamida (vitamina B3). En determinadas realizaciones, el cinc está presente en el medio de cultivo a una concentración de al menos o aproximadamente 2 μ M, 5 μ M, entre 2 μ M y 12 μ M, entre 5 μ M y 12 μ M, o al menos 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 6 μ M, 7 μ M, 8 μ M, 9 μ M, 10 μ M, 11 μ M, 12 μ M, 13 μ M, 14 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M, 30 μ M o más. En determinadas realizaciones, el calcio está presente en el medio de cultivo a una concentración de al menos o aproximadamente 0,5 mM, 1,5 mM, entre 0,5 y 1,5, o 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. En determinadas realizaciones, la nicotinamida (vitamina B3) está

presente en el medio de cultivo a una concentración de al menos o aproximadamente 2 mg/l, 7 mg/l, entre 2 mg/l y 7 mg/l, o al menos o aproximadamente 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 más.

5 Tal como se da a conocer expresamente en el presente documento, y se facilita como Var. 14 a Var. 93 (tabla 3 a tabla 6), se contempla cualquier combinación de concentraciones de los tres componentes (es decir, cinc, calcio y nicotinamida (vitamina B3)) para su uso en los procedimientos de la invención. En una realización, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En una realización específica, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a 36 °C. En una realización, la temperatura y/o el pH del cultivo se mantienen durante al menos 7 días. En una realización, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En una realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo quimiostático. En otra realización específica, la condición de cultivo continuo es una condición de cultivo en perfusión. En una realización, la célula que alberga el ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 es una célula de mamífero. En realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina.

Tabla 3. Realizaciones a modo de ejemplo de medios de cultivo que contienen nicotinamida (vitamina B3) al menos 2 mg/l, que son útiles para la expresión de una proteína ADAMTS13.

	Calcio al menos 0,5 mM	Calcio al menos 1,5 mM	Calcio entre 0,5 mM y 1,5 mM	Calcio 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
Cinc al menos 2 µM	Var. 14	Var. 15	Var. 16	Var. 17
Cinc al menos 5 µM	Var. 18	Var. 19	Var. 20	Var. 21
Cinc entre 2 µM y 12 µM	Var. 22	Var. 23	Var. 24	Var. 25
Cinc entre 5 µM y 12 µM	Var. 26	Var. 27	Var. 28	Var. 29
Cinc al menos 3 µM, 4 µM, 5 µM, 6 µM, 7 µM, 8 µM, 9 µM, 10 µM, 11 µM, 12 µM, y en determinados aspectos comparativos 13 µM, 14 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM o más	Var. 30	Var. 31	Var. 32	Var. 33

*Var. = Variación

25 Tabla 4. Realizaciones a modo de ejemplo de medios de cultivo que contienen nicotinamida (vitamina B3) al menos 7 mg/l, que son útiles para la expresión de una proteína ADAMTS13.

	Calcio al menos 0,5 mM	Calcio al menos 1,5 mM	Calcio entre 0,5 mM y 1,5 mM	Calcio 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
Cinc al menos 2 µM	Var. 34	Var. 35	Var. 36	Var. 37
Cinc al menos 5 µM	Var. 38	Var. 39	Var. 40	Var. 41
Cinc entre 2 µM y 12 µM	Var. 42	Var. 43	Var. 44	Var. 45
Cinc entre 5 µM y 12 µM	Var. 46	Var. 47	Var. 48	Var. 49
Cinc al menos 3 µM, 4 µM,	Var. 50	Var. 51	Var. 52	Var. 53

	Calcio al menos 0,5 mM	Calcio al menos 1,5 mM	Calcio entre 0,5 mM y 1,5 mM	Calcio 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
5 μ M, 6 μ M, 7 μ M, 8 μ M, 9 μ M, 10 μ M, 11 μ M, 12 μ M, y en determinados aspectos comparativos 13 μ M, 14 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M, 30 μ M o más				

*Var. = Variación

Tabla 5. Realizaciones a modo de ejemplo de medios de cultivo que contienen nicotinamida (vitamina B3) entre 2 y 7 mg/l, que son útiles para la expresión de una proteína ADAMTS13.

	Calcio al menos 0,5 mM	Calcio al menos 1,5 mM	Calcio entre 0,5 mM y 1,5 mM	Calcio 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
Cinc al menos 2 μ M	Var. 54	Var. 55	Var. 56	Var. 57
Cinc al menos 5 μ M	Var. 58	Var. 59	Var. 60	Var. 61
Cinc entre 2 μ M y 12 μ M	Var. 62	Var. 63	Var. 64	Var. 65
Cinc entre 5 μ M y 12 μ M	Var. 66	Var. 67	Var. 68	Var. 69
Cinc al menos 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 6 μ M, 7 μ M, 8 μ M, 9 μ M, 10 μ M, 11 μ M, 12 μ M, y en determinados aspectos comparativos 13 μ M, 14 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M, 30 μ M o más	Var. 70	Var. 71	Var. 72	Var. 73

*Var. = Variación

5

Tabla 6. Realizaciones a modo de ejemplo de medios de cultivo que contienen nicotinamida (vitamina B3) al menos 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 más, que son útiles para la expresión de una proteína ADAMTS13.

	Calcio al menos 0,5 mM	Calcio al menos 1,5 mM	Calcio entre 0,5 mM y 1,5 mM	Calcio 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
Cinc al menos 2 μ M	Var. 74	Var. 75	Var. 76	Var. 77
Cinc al menos 5 μ M	Var. 78	Var. 79	Var. 80	Var. 81
Cinc entre 2 μ M y 12 μ M	Var. 82	Var. 83	Var. 84	Var. 85
Cinc entre 5 μ M y 12 μ M	Var. 86	Var. 87	Var. 88	Var. 89
Cinc al menos 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 6 μ M, 7 μ M, 8 μ M, 9 μ M, 10 μ M, 11 μ M,	Var. 90	Var. 91	Var. 92	Var. 93

	Calcio al menos 0,5 mM	Calcio al menos 1,5 mM	Calcio entre 0,5 mM y 1,5 mM	Calcio 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
12 μ M, y en determinados aspectos comparativos 13 μ M, 14 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M, 30 μ M o más				

*Var. = Variación

B. Células huésped y vectores

5 Pueden producirse proteínas recombinantes ADAMTS mediante la expresión en cualquier sistema de huésped procarionota 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 célula 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 preferente, la línea celular es una línea celular CHO.

15 En una realización, las células pueden ser cualquier célula de mamífero que puede cultivarse, preferentemente en un procedimiento de fabricación (es decir, al menos 1 litro), 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); línea de riñón de embrión humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., *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 subclon 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 (CV ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical 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 y col., *Annals N. Y. Acad. Sci.*, 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y la línea de hepatoma humano (Hep G2). Preferentemente, la línea celular es una línea celular de roedor, especialmente una línea celular de hámster tal como CHO o BHK.

30 Puede usarse una amplia variedad de vectores para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) y pueden seleccionarse de vectores de expresión eucariotas y procarionotas. 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 replicación 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 son capaces de proporcionar selección fenotípica. El plásmido comprenderá una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) unida operativamente a una o más secuencias de control, por ejemplo, un promotor.

40 Un procedimiento preferente 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, esencialmente tal como se describe en la patente estadounidense número 5.250.421 (Kaufman y col., Genetics Institute, Inc.). 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 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).

50 En otra realización preferente, se preparan células HEK293 estables transfectando con una construcción 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 en células (por ejemplo, células de mamífero). Por consiguiente, en determinadas realizaciones, se usa un vector viral para introducir una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en una célula huésped para su expresión. El vector viral comprenderá una secuencia de nucleótidos que codifica 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 las construcciones que contienen secuencias de adenovirus suficientes para soportar el empaquetamiento de la construcción y, en última instancia, para expresar una construcción de ADAMTS que se ha clonado en el mismo. Los vectores adenovirales permiten la introducción de secuencias extrañas de hasta 7 kb (Grunhaus y col., *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 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 y col., *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 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 y col., *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 y col., *Science*, 272(5259):263-267, 1996; Zufferey y col., *Nat Biotechnol*, 15(9):871-875, 1997; Blomer y col., *J Virol.*, 71(9):6641-6649, 1997; patentes estadounidenses n.º 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 expresión en levaduras, vectores tales como pAO, pPIC, pYES, pMET, que usan promotores tales como AOX1, GAP, GAL1, AUG1, etc.; (ii) para expresión en células de insecto, vectores tales como pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC, etc., que usan promotores tales como PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh, etc., y (iii) para expresión en células de mamífero, vectores tales como pSVL, pCMV, pRc/VRS, pcDNA3, pBPV, etc., y vectores derivados de sistemas virales tales como virus vaccinia, virus adenoasociados, herpesvirus, retrovirus, etc., que usan promotores tales como de CMV, SV40, EF-1, UbC, VRS, ADV, VPB y β -actina.

En determinadas realizaciones, los procedimientos de cultivo celular de la invención pueden comprender el uso de un microportador. La presente invención proporciona, entre otros aspectos, procedimientos 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 grandes áreas de superficie de cultivo específicas de volumen para lograr densidades celulares y expresión de proteínas altas. Un medio para proporcionar tales condiciones de crecimiento es usar microvehículos 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.

C. Procedimientos de cultivo

En determinadas realizaciones, los procedimientos de la presente invención 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, por ejemplo, en modo en perfusión, turbidostato o quimiostato. El cultivo celular discontinuo y continuo pueden realizarse en condiciones o bien en suspensión o bien en adherencia. Cuando se hacen funcionar en condiciones en suspensión, las células estarán suspendidas libremente y se mezclarán dentro del medio de cultivo. Alternativamente, en condiciones en 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 único lote. Un cultivo

semicontinuo normalmente es un cultivo discontinuo al que se suministran o bien nutrientes nuevos (por ejemplo, sustratos limitantes del crecimiento) o bien aditivos (por ejemplo, precursores para los productos). La solución alimentada habitualmente está altamente concentrada para evitar la dilución del biorreactor. En un cultivo de lotes repetidos, 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 recuperarse una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) tras recoger el 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 procedimientos en 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 procedimiento en 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 procedimiento en 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 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 procedimientos 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.

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.

Los procedimientos de la invención pueden comprender el uso de cultivo celular semicontinuo o cultivo celular continuo, tal como cultivo celular en perfusión o quimiostático, para la expresión de una proteína ADAMTS. En determinadas realizaciones, se encontró que los medios de cultivo semicontinuos complementados con cinc a concentraciones de hasta al menos aproximadamente 12 μM proporcionaban expresión de una proteína ADAMTS con actividades específicas aumentadas (tabla 20). De manera notable, en cultivos semicontinuos complementados con cinc a una concentración final de 12 μM las tasas de crecimiento celular específicas y la actividad total no resultaron afectadas, mientras que las actividades específicas de las proteínas ADAMTS13 expresadas continuaron aumentando. Esto está en contraposición con lo que se observó en experimentos que emplean cultivos celulares en quimiostato. En estos experimentos, la complementación del medio de cultivo con cinc a una concentración final de 5 μM dio como resultado un aumento en la actividad específica de ADAMTS13 en el sobrenadante (tabla 21). Sin embargo, a niveles de complementación superiores, 8,5 μM y 12 μM , las tasas de crecimiento celular específicas y los rendimientos de proteína ADAMTS13 totales disminuyeron, aunque la actividad específica de ADAMTS13 en el sobrenadante de cultivo permaneció alta.

Por consiguiente, en una realización los procedimientos de la invención comprenden el uso de un cultivo celular semicontinuo con un medio que comprende cinc a una concentración de cinc de al menos o aproximadamente 2 μM , al menos o aproximadamente 5 μM , de o aproximadamente entre 2 μM y 12 μM , de o aproximadamente entre 2 μM y 5 μM , de o aproximadamente entre 5 μM y 12 μM , o al menos o aproximadamente 3 μM , en determinados aspectos comparativos 4 μM , 5 μM , 6 μM , 7 μM , 8 μM , 9 μM , 10 μM , 11 μM , 12 μM , en determinados aspectos comparativos 13 μM , 14 μM , 15 μM , 20 μM , 25 μM , 30 μM o más. En algunas realizaciones, la concentración de cinc puede ser de desde al menos aproximadamente 5 μM hasta al menos aproximadamente 12 μM . En determinadas realizaciones, el medio puede ser un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente.

1. Cultivo continuo

Ventajosamente, la presente invención proporciona procedimientos de expresión de una proteína ADAMTS, por ejemplo ADAMTS13, con actividad específica alta en un cultivo continuo. Estos procedimientos permiten la expresión y purificación continuas de proteínas ADAMTS procedentes de un único cultivo a lo largo de periodos de tiempo prolongados. Específicamente, se encontró que podían mantenerse niveles altos de expresión y actividad específica de proteína ADAMTS13 durante al menos 53 días en un biorreactor de quimiostato de 10 l, en las condiciones proporcionadas por la presente invención (ejemplo 3, véase, tabla 15). En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona procedimientos de expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) con alta especificidad durante un periodo de tiempo prolongado. En determinadas realizaciones, el cultivo se mantiene durante al menos o aproximadamente 7 días, o al menos o aproximadamente 14 días, 21 días, 28 días, o al menos o aproximadamente 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, o al menos o aproximadamente 2 meses, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses o más. En algunas de estas realizaciones, el nivel de expresión, actividad o actividad específica totales de la proteína ADAMTS se mantiene en el cultivo durante un periodo de tiempo prolongado. En otras realizaciones, la tasa de crecimiento específica, la densidad celular, y similares se mantiene en el cultivo durante un periodo de tiempo prolongado. En algunas realizaciones, el medio de cultivo puede complementarse con al menos uno de calcio, cinc, o nicotinamida (vitamina B3), por ejemplo, a una concentración según una cualquiera de Var. 1 a Var. 149 (tabla 2 a tabla 9). En una realización particular, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en quimiostato. En otra realización, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en turbidostato. Aún en otra realización, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en perfusión. En determinadas realizaciones, el medio puede ser un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En una realización, puede usarse una técnica de cultivo celular continuo para expresar una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un cultivo celular que contiene cinc, calcio y/o nicotinamida (vitamina B3) a una concentración según una cualquiera de Var. 1 a Var. 149 (tabla 2 a tabla 9) durante al menos 7 días. En otra realización, puede usarse una técnica de cultivo celular continuo para expresar una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un cultivo celular que contiene cinc, calcio y/o nicotinamida (vitamina B3) a una concentración según una cualquiera de Var. 1 a Var. 149 (tabla 2 a tabla 9) durante al menos 14 días. En otra realización, puede usarse una técnica de cultivo celular continuo para expresar una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un cultivo celular que contiene cinc, calcio y/o nicotinamida (vitamina B3) a una concentración según una cualquiera de Var. 1 a Var. 149 (tabla 2 a tabla 9) durante al menos 21 días. En otra realización, puede usarse una técnica de cultivo celular continuo para expresar una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un cultivo celular que contiene cinc, calcio y/o nicotinamida (vitamina B3) a una concentración según una cualquiera de Var. 1 a Var. 149 (tabla 2 a tabla 9) durante al menos 1 mes. En otra realización, puede usarse una técnica de cultivo celular continuo para expresar una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un cultivo celular que contiene cinc, calcio y/o nicotinamida (vitamina B3) a una concentración según una cualquiera de Var. 1 a Var. 149 (tabla 2 a tabla 9) durante al menos 2 meses. En otra realización, puede usarse una técnica de cultivo celular continuo para expresar una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un cultivo celular que contiene cinc, calcio y/o nicotinamida (vitamina B3) a una concentración según una cualquiera de Var. 1 a Var. 149 (tabla 2 a tabla 9) durante al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o más meses. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En determinadas realizaciones, los procedimientos de expresión de proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) pueden comprender el uso de cultivo celular continuo con un medio que comprende cinc a una concentración de cinc de al menos o aproximadamente 2 μM , cinc al menos o aproximadamente 5 μM , cinc a o aproximadamente a entre 2 μM y 12 μM , cinc a o aproximadamente a entre 2 μM y 5 μM , cinc a o aproximadamente a entre 3 μM y 5 μM , cinc a o aproximadamente a entre 5 μM y 12 μM , o cinc al menos o aproximadamente 3 μM , 4 μM , 5 μM , 6 μM , 7 μM , 8 μM , 9 μM , 10 μM , 11 μM , 12 μM , en determinados aspectos comparativos 13 μM , 14 μM , 15 μM , 20 μM , 25 μM , 30 μM o más durante al menos 7 días. En una realización particular, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en quimiostato. En otra realización, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en turbidostato. Aún en otra realización, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en perfusión. En determinadas realizaciones, el medio puede ser un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En una realización, un procedimiento para la expresión de una proteína ADAMTS comprende cultivar, en condiciones de cultivo continuo, una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un medio de cultivo que contiene cinc al menos o aproximadamente 2 μM durante al menos 7 días. En otras realizaciones, el medio de cultivo contendrá cinc al menos aproximadamente 3 μM . En otra realización, el medio de cultivo contendrá cinc al menos aproximadamente 5 μM . En otra realización, el medio de cultivo contendrá o contendrá aproximadamente entre cinc 2 μM y cinc 5 μM . En otra realización, el medio de cultivo contendrá o contendrá aproximadamente entre cinc 3 μM y cinc 5 μM . En otra realización, el medio de cultivo contendrá o contendrá aproximadamente entre cinc 2 μM y cinc 12 μM . En otra realización, el medio de cultivo

contendrá o contendrá aproximadamente entre cinc 3 μM y cinc 12 μM . En otra realización, el medio de cultivo contendrá o contendrá aproximadamente entre cinc 5 μM y cinc 12 μM . En otra realización, el medio de cultivo contendrá cinc al menos 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 determinadas realizaciones, el cultivo se mantiene durante al menos 7 días, o al menos 14 días, 21 días, 28 días, o al menos 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, o al menos 2 meses, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses o más. En una realización particular, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en quimiostato. En otra realización, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en turbidostato. Aún en otra realización, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en perfusión. En determinadas realizaciones, el medio puede ser un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En una realización, un procedimiento para la expresión de una proteína ADAMTS comprende cultivar, en condiciones de cultivo continuo, una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un medio de cultivo que contiene calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM durante al menos 7 días. En otras realizaciones, el medio de cultivo contendrá calcio al menos aproximadamente 1,0 mM. En otra realización, el medio de cultivo contendrá calcio a o aproximadamente a entre 0,5 mM y 1,5 mM. En otra realización, el medio de cultivo contendrá calcio a o aproximadamente a entre 1,0 mM y 1,5 mM. En otra realización, el medio de cultivo contendrá calcio al menos 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 determinadas realizaciones, el cultivo se mantiene durante al menos 7 días, o al menos 14 días, 21 días, 28 días, o al menos 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, o al menos 2 meses, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses o más. En una realización particular, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en quimiostato. En otra realización, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en turbidostato. Aún en otra realización, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en perfusión. En determinadas realizaciones, el medio puede ser un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En una realización, un procedimiento para la expresión de una proteína ADAMTS comprende cultivar, en condiciones de cultivo continuo, una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un medio de cultivo que contiene nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 2 mg/l durante al menos 7 días. En otras realizaciones, el medio de cultivo contendrá nicotinamida (vitamina B3) al menos aproximadamente 5 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo contendrá nicotinamida (vitamina B3) al menos aproximadamente 7 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo contendrá nicotinamida (vitamina B3) a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 7 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo contendrá nicotinamida (vitamina B7) a o aproximadamente a entre 5 mg/l y 7 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo contendrá nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 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 más. En determinadas realizaciones, el cultivo se mantiene durante al menos 7 días, o al menos 14 días, 21 días, 28 días, o al menos 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, o al menos 2 meses, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses o más. En una realización particular, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en quimiostato. En otra realización, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en turbidostato. Aún en otra realización, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en perfusión. En determinadas realizaciones, el medio puede ser un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En una realización, un procedimiento para la expresión de una proteína ADAMTS comprende cultivar, en condiciones de cultivo continuo, una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un medio de cultivo complementado tanto con cinc como con calcio durante al menos 7 días. En determinadas realizaciones, las concentraciones de cinc y calcio pueden ser cualquiera de las descritas en el presente documento. En determinadas realizaciones, las concentraciones de cinc y calcio serán una de Var. 94 a Var. 113 (tabla 7). En determinadas realizaciones, el cultivo se mantiene durante al menos 7 días, o al menos 14 días, 21 días, 28 días, o al menos 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, o al menos 2 meses, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses o más. En una realización particular, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en quimiostato. En otra realización, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en turbidostato. Aún en otra realización, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en perfusión. En determinadas realizaciones, el medio puede ser un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En una realización, un procedimiento para la expresión de una proteína ADAMTS comprende cultivar, en condiciones de cultivo continuo, una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un medio de cultivo complementado tanto con cinc como con nicotinamida (vitamina B3) durante al menos 7 días. En determinadas realizaciones, las concentraciones de cinc y nicotinamida (vitamina B3) pueden ser cualquiera de las descritas en el presente documento. En determinadas realizaciones, las concentraciones de cinc y nicotinamida (vitamina B3) serán una de Var. 114 a Var. 133 (tabla 8). En determinadas realizaciones, el cultivo se mantiene durante al menos 7 días, o al menos 14 días, 21 días, 28 días, o al menos 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, o al menos 2 meses, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses

o más. En una realización particular, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en quimiostato. En otra realización, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en turbidostato. Aún en otra realización, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en perfusión. En determinadas realizaciones, el medio puede ser un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En una realización, un procedimiento para la expresión de una proteína ADAMTS comprende cultivar, en condiciones de cultivo continuo, una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un medio de cultivo complementado tanto con calcio como con nicotinamida (vitamina B3) durante al menos 7 días. En determinadas realizaciones, las concentraciones de calcio y nicotinamida (vitamina B3) pueden ser cualquiera de las descritas en el presente documento. En determinadas realizaciones, las concentraciones de calcio y nicotinamida (vitamina B3) serán una de Var. 134 a Var. 149 (tabla 9). En determinadas realizaciones, el cultivo se mantiene durante al menos 7 días, o al menos 14 días, 21 días, 28 días, o al menos 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, o al menos 2 meses, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses o más. En una realización particular, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en quimiostato. En otra realización, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en turbidostato. Aún en otra realización, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en perfusión. En determinadas realizaciones, el medio puede ser un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En una realización, un procedimiento para la expresión de una proteína ADAMTS comprende cultivar, en condiciones de cultivo continuo, una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un medio de cultivo complementado con cinc, calcio y nicotinamida (vitamina B3) durante al menos 7 días. En determinadas realizaciones, las concentraciones de cinc, calcio y nicotinamida (vitamina B3) pueden ser cualquiera de las descritas en el presente documento. En determinadas realizaciones, las concentraciones de cinc, calcio y nicotinamida (vitamina B3) serán una de Var. 14 a Var. 93 (tabla 3 a tabla 6). En determinadas realizaciones, el cultivo se mantiene durante al menos 7 días, o al menos 14 días, 21 días, 28 días, o al menos 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, o al menos 2 meses, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses o más. En una realización particular, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en quimiostato. En otra realización, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en turbidostato. Aún en otra realización, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en perfusión. En determinadas realizaciones, el medio puede ser un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En una realización, el cultivo se mantiene a una densidad celular de entre aproximadamente $0,5 \times 10^6$ y 4×10^7 células/ml durante un periodo de tiempo prolongado. En otras realizaciones, la densidad celular se mantiene a una concentración de entre aproximadamente $1,0 \times 10^6$ y aproximadamente $1,0 \times 10^7$ células/ml durante un periodo de tiempo prolongado. En otras realizaciones, la densidad celular se mantiene a una concentración de entre aproximadamente $1,0 \times 10^6$ y aproximadamente $4,0 \times 10^6$ células/ml durante un periodo de tiempo prolongado. En otras realizaciones, la densidad celular se mantiene a una concentración de entre aproximadamente $1,0 \times 10^6$ y aproximadamente $4,0 \times 10^6$ células/ml durante un periodo de tiempo prolongado. Aún en otras realizaciones, la densidad celular puede mantenerse a una concentración de entre aproximadamente $2,0 \times 10^6$ y aproximadamente $4,0 \times 10^6$, o entre aproximadamente $1,0 \times 10^6$ y aproximadamente $2,5 \times 10^6$, o entre aproximadamente $1,5 \times 10^6$ y aproximadamente $3,5 \times 10^6$, o cualquier otro intervalo similar, durante un periodo de tiempo prolongado. La densidad celular a la que se mantiene un cultivo celular para la producción de una proteína ADAMTS recombinante (por ejemplo, ADAMTS13) dependerá de las condiciones de cultivo y del medio usado para la expresión de la proteína. Un experto en la técnica podrá determinar fácilmente la densidad celular óptima para un cultivo celular que produce una proteína ADAMTS. En determinadas realizaciones, el cultivo se mantiene durante al menos 7 días, o al menos 14 días, 21 días, 28 días, o al menos 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, o al menos 2 meses, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses o más. En una realización particular, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en quimiostato. En otra realización, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en turbidostato. Aún en otra realización, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en perfusión. En determinadas realizaciones, el medio puede ser un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En otras realizaciones, los procedimientos de expresión de ADAMTS13 permiten la producción de al menos o aproximadamente 500 unidades de actividad de ADAMTS13 por litro de cultivo al día (500 U//d), por ejemplo unidades de actividad mediante FRETS-VWF73, con una actividad específica de A13 de al menos o aproximadamente 500 U/mg. En otras realizaciones, los procedimientos de expresión de ADAMTS13 permiten la producción de al menos o aproximadamente 600 U//d. En otras realizaciones, los procedimientos de expresión de ADAMTS13 permiten la producción de al menos o aproximadamente 700 U//d. En otras realizaciones, los procedimientos de expresión de ADAMTS13 permiten la producción de al menos o aproximadamente 800 U//d. En otras realizaciones, los procedimientos de expresión de ADAMTS13 permiten la producción de al menos o aproximadamente 900 U//d. En otras realizaciones, los procedimientos de expresión de ADAMTS13 permiten la producción de al menos o aproximadamente 1000 U//d. En otras realizaciones, los procedimientos de expresión de ADAMTS13 permiten la producción de al menos o aproximadamente 1100 U//d. En otras realizaciones, los

procedimientos de expresión de ADAMTS13 permiten la producción de al menos o aproximadamente 1200 U//d. En otras realizaciones, los procedimientos de expresión de ADAMTS13 permiten la producción de al menos o aproximadamente 1300 U//d. En otras realizaciones, los procedimientos de expresión de ADAMTS13 permiten la producción de al menos o aproximadamente 1400 U//d. En otras realizaciones, los procedimientos de expresión de ADAMTS13 permiten la producción de al menos o aproximadamente 1500 U//d. Aún en otras realizaciones, los procedimientos de expresión de ADAMTS13 permiten la producción de al menos o aproximadamente 2000 U//d. En una realización particular, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en turbidostato. En otra realización, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en perfusión. En determinadas realizaciones, el medio puede ser un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En otra realización, los procedimientos permiten la expresión ampliada de la proteína ADAMTS13 con actividades específicas altas, por ejemplo, una actividad específica de proteína A13 de al menos aproximadamente 600 U/mg, o de proteína A13 de al menos aproximadamente 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000 o más U/mg durante un periodo de tiempo prolongado. En determinadas realizaciones, el cultivo se mantiene durante al menos 7 días, o al menos 14 días, 21 días, 28 días, o al menos 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, o al menos 2 meses, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses o más. En una realización particular, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en quimiostato. En otra realización, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en turbidostato. Aún en otra realización, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular en perfusión. En determinadas realizaciones, el medio puede ser un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

2. Cultivo discontinuo

En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos de expresión de una proteína ADAMTS, por ejemplo ADAMTS13, con actividad específica alta en un cultivo discontinuo. En algunas realizaciones, el medio de cultivo puede complementarse con al menos uno de calcio, cinc o nicotinamida (vitamina B3), por ejemplo, a una concentración según una cualquiera de Var. 1 a Var. 149 (tabla 2 a tabla 9). En una realización particular, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular de un único lote. En otra realización, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular semicontinuo. Aún en otra realización, el procedimiento comprende el uso de cultivo celular de lotes repetidos. En algunas realizaciones, los cultivos pueden realizarse como cultivos discontinuos en suspensión. En otras realizaciones, los cultivos pueden realizarse como cultivos discontinuos adherentes. En determinadas realizaciones, el medio puede ser un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En una realización, puede usarse una técnica de cultivo celular semicontinuo o de lotes repetidos para expresar una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un cultivo celular que contiene cinc, calcio y/o nicotinamida (vitamina B3) a una concentración según una cualquiera de Var. 1 a Var. 149 (tabla 2 a tabla 9) durante al menos 7 días. En otra realización, puede usarse una técnica de cultivo celular semicontinuo o de lotes repetidos para expresar una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un cultivo celular que contiene cinc, calcio y/o nicotinamida (vitamina B3) a una concentración según una cualquiera de Var. 1 a Var. 149 (tabla 2 a tabla 9) durante al menos 14 días. En otra realización, puede usarse una técnica de cultivo celular semicontinuo o de lotes repetidos para expresar una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un cultivo celular que contiene cinc, calcio y/o nicotinamida (vitamina B3) a una concentración según una cualquiera de Var. 1 a Var. 149 (tabla 2 a tabla 9) durante al menos 21 días. En otra realización, puede usarse una técnica de cultivo celular semicontinuo o de lotes repetidos para expresar una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un cultivo celular que contiene cinc, calcio y/o nicotinamida (vitamina B3) a una concentración según una cualquiera de Var. 1 a Var. 149 (tabla 2 a tabla 9) durante al menos 1 mes. En otra realización, puede usarse una técnica de cultivo celular semicontinuo o de lotes repetidos para expresar una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un cultivo celular que contiene cinc, calcio y/o nicotinamida (vitamina B3) a una concentración según una cualquiera de Var. 1 a Var. 149 (tabla 2 a tabla 9) durante al menos 2 meses. En otra realización, puede usarse una técnica de cultivo celular semicontinuo o de lotes repetidos para expresar una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un cultivo celular que contiene cinc, calcio y/o nicotinamida (vitamina B3) a una concentración según una cualquiera de Var. 1 a Var. 149 (tabla 2 a tabla 9) durante al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o más meses. En algunas realizaciones, los cultivos pueden realizarse como cultivos discontinuos en suspensión. En otras realizaciones, los cultivos pueden realizarse como cultivos discontinuos adherentes. En determinadas realizaciones, el medio puede ser un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En determinadas realizaciones, los procedimientos de expresión de proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) pueden comprender el uso de cultivo celular semicontinuo o de lotes repetidos con un medio que comprende cinc a una concentración de cinc de al menos o aproximadamente 2 μ M, cinc al menos o aproximadamente 5 μ M, cinc a o aproximadamente a entre 2 μ M y 12 μ M, cinc a o aproximadamente a entre 2 μ M y 5 μ M, cinc a o aproximadamente a entre 3 μ M y 5 μ M, cinc a o aproximadamente a entre 5 μ M y 12 μ M, o cinc al menos o aproximadamente 3 μ M,

4 μ M, 5 μ M, 6 μ M, 7 μ M, 8 μ M, 9 μ M, 10 μ M, 11 μ M, 12 μ M, en determinados aspectos comparativos 13 μ M, 14 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M, 30 μ M o más durante al menos 7 días. En algunas realizaciones, los cultivos pueden realizarse como cultivos discontinuos en suspensión. En otras realizaciones, los cultivos pueden realizarse como cultivos discontinuos adherentes. En determinadas realizaciones, el medio puede ser un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En una realización, un procedimiento para la expresión de una proteína ADAMTS comprende cultivar, en condiciones de cultivo semicontinuo o de lotes repetidos, una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un medio de cultivo que contiene calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM durante al menos 7 días. En otras realizaciones, el medio de cultivo contendrá calcio al menos aproximadamente 1,0 mM. En otra realización, el medio de cultivo contendrá calcio al menos aproximadamente 1,5 mM. En otra realización, el medio de cultivo contendrá calcio a o aproximadamente a entre 0,5 mM y 1,5 mM. En otra realización, el medio de cultivo contendrá calcio a o aproximadamente a entre 1,0 mM y 1,5 mM. En otra realización, el medio de cultivo contendrá calcio al menos 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 determinadas realizaciones, el cultivo se mantiene durante al menos 7 días, o al menos 14 días, 21 días, 28 días, o al menos 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, o al menos 2 meses, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses o más. En algunas realizaciones, los cultivos pueden realizarse como cultivos discontinuos en suspensión. En otras realizaciones, los cultivos pueden realizarse como cultivos discontinuos adherentes. En determinadas realizaciones, el medio puede ser un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En una realización, un procedimiento para la expresión de una proteína ADAMTS comprende cultivar, en condiciones de cultivo semicontinuo o de lotes repetidos, una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un medio de cultivo que contiene nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 2 mg/l durante al menos 7 días. En otras realizaciones, el medio de cultivo contendrá nicotinamida (vitamina B3) al menos aproximadamente 5 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo contendrá nicotinamida (vitamina B3) al menos aproximadamente 7 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo contendrá nicotinamida (vitamina B3) a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 7 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo contendrá nicotinamida (vitamina B7) a o aproximadamente a entre 5 mg/l y 7 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo contendrá nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 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 más. En determinadas realizaciones, el cultivo se mantiene durante al menos 7 días, o al menos 14 días, 21 días, 28 días, o al menos 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, o al menos 2 meses, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses o más. En algunas realizaciones, los cultivos pueden realizarse como cultivos discontinuos en suspensión. En otras realizaciones, los cultivos pueden realizarse como cultivos discontinuos adherentes. En determinadas realizaciones, el medio puede ser un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En una realización, un procedimiento para la expresión de una proteína ADAMTS comprende cultivar, en condiciones de cultivo semicontinuo o de lotes repetidos, una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un medio de cultivo complementado tanto con cinc como con calcio durante al menos 7 días. En determinadas realizaciones, las concentraciones de cinc y calcio pueden ser cualquiera de las descritas en el presente documento. En determinadas realizaciones, las concentraciones de cinc y calcio serán una de Var. 94 a Var. 113 (tabla 7). En determinadas realizaciones, el cultivo se mantiene durante al menos 7 días, o al menos 14 días, 21 días, 28 días, o al menos 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, o al menos 2 meses, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses o más. En algunas realizaciones, los cultivos pueden realizarse como cultivos discontinuos en suspensión. En otras realizaciones, los cultivos pueden realizarse como cultivos discontinuos adherentes. En determinadas realizaciones, el medio puede ser un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En una realización, un procedimiento para la expresión de una proteína ADAMTS comprende cultivar, en condiciones de cultivo semicontinuo o de lotes repetidos, una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un medio de cultivo complementado tanto con cinc como con nicotinamida (vitamina B3) durante al menos 7 días. En determinadas realizaciones, las concentraciones de cinc y nicotinamida (vitamina B3) pueden ser cualquiera de las descritas en el presente documento. En determinadas realizaciones, las concentraciones de cinc y nicotinamida (vitamina B3) serán una de Var. 114 a Var. 133 (tabla 8). En determinadas realizaciones, el cultivo se mantiene durante al menos 7 días, o al menos 14 días, 21 días, 28 días, o al menos 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, o al menos 2 meses, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses o más. En algunas realizaciones, los cultivos pueden realizarse como cultivos discontinuos en suspensión. En otras realizaciones, los cultivos pueden realizarse como cultivos discontinuos adherentes. En determinadas realizaciones, el medio puede ser un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En una realización, un procedimiento para la expresión de una proteína ADAMTS comprende cultivar, en condiciones de cultivo semicontinuo o de lotes repetidos, una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un medio de cultivo complementado tanto con calcio como con nicotinamida (vitamina B3) durante al menos 7 días. En determinadas realizaciones, las concentraciones de calcio y nicotinamida (vitamina B3) pueden ser cualquiera de las descritas en el presente documento. En determinadas realizaciones, las concentraciones de calcio y nicotinamida (vitamina B3) serán una de Var. 134 a Var. 149 (tabla 9). En determinadas realizaciones, el cultivo se mantiene durante al menos 7 días, o al menos 14 días, 21 días, 28 días, o al menos 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, o al menos 2 meses, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses o más. En algunas realizaciones, los cultivos pueden realizarse como cultivos discontinuos en suspensión. En otras realizaciones, los cultivos pueden realizarse como cultivos discontinuos adherentes. En determinadas realizaciones, el medio puede ser un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos definido químicamente. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En una realización, un procedimiento para la expresión de una proteína ADAMTS comprende cultivar, en condiciones de cultivo semicontinuo o de lotes repetidos, una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un medio de cultivo complementado con cinc, calcio y nicotinamida (vitamina B3) durante al menos 7 días. En determinadas realizaciones, las concentraciones de cinc, calcio y nicotinamida (vitamina B3) pueden ser cualquiera de las descritas en el presente documento. En determinadas realizaciones, las concentraciones de cinc, calcio y nicotinamida (vitamina B3) serán una de Var. 14 a Var. 93 (tabla 3 a tabla 6). En determinadas realizaciones, el cultivo se mantiene durante al menos 7 días, o al menos 14 días, 21 días, 28 días, o al menos 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, o al menos 2 meses, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses o más. En algunas realizaciones, los cultivos pueden realizarse como cultivos discontinuos en suspensión. En otras realizaciones, los cultivos pueden realizarse como cultivos discontinuos adherentes. En determinadas realizaciones, el medio puede ser un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En una realización, el cultivo se mantiene a una densidad celular de entre aproximadamente $0,5 \times 10^6$ y 4×10^7 células/ml durante un periodo de tiempo prolongado. En otras realizaciones, la densidad celular se mantiene a una concentración de entre aproximadamente $1,0 \times 10^6$ y aproximadamente $1,0 \times 10^7$ células/ml durante un periodo de tiempo prolongado. En otras realizaciones, la densidad celular se mantiene a una concentración de entre aproximadamente $1,0 \times 10^6$ y aproximadamente $4,0 \times 10^6$ células/ml durante un periodo de tiempo prolongado. En otras realizaciones, la densidad celular se mantiene a una concentración de entre aproximadamente $1,0 \times 10^6$ y aproximadamente $4,0 \times 10^6$ células/ml durante un periodo de tiempo prolongado. Aún en otras realizaciones, la densidad celular puede mantenerse a una concentración de entre aproximadamente $2,0 \times 10^6$ y aproximadamente $4,0 \times 10^6$, o entre aproximadamente $1,0 \times 10^6$ y aproximadamente $2,5 \times 10^6$, o entre aproximadamente $1,5 \times 10^6$ y aproximadamente $3,5 \times 10^6$, o cualquier otro intervalo similar, durante un periodo de tiempo prolongado. La densidad celular a la que se mantiene un cultivo celular para la producción de una proteína ADAMTS recombinante (por ejemplo, ADAMTS13) dependerá de las condiciones de cultivo y del medio usado para la expresión de la proteína. Un experto en la técnica podrá determinar fácilmente la densidad celular óptima para un cultivo celular que produce una proteína ADAMTS. En determinadas realizaciones, el cultivo se mantiene durante al menos 7 días, o al menos 14 días, 21 días, 28 días, o al menos 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, o al menos 2 meses, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses o más. En algunas realizaciones, los cultivos pueden realizarse como cultivos discontinuos en suspensión. En otras realizaciones, los cultivos pueden realizarse como cultivos discontinuos adherentes. En determinadas realizaciones, el medio puede ser un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En otras realizaciones, los procedimientos de expresión de ADAMTS13 permiten la producción de al menos o aproximadamente 500 unidades de actividad de ADAMTS13 por litro de cultivo al día (500 U//d), por ejemplo unidades de actividad mediante FRETS-VWF73, con una actividad específica de A13 de al menos o aproximadamente 500 U/mg. En otras realizaciones, los procedimientos de expresión de ADAMTS13 permiten la producción de al menos o aproximadamente 600 U//d. En otras realizaciones, los procedimientos de expresión de ADAMTS13 permiten la producción de al menos o aproximadamente 700 U//d. En otras realizaciones, los procedimientos de expresión de ADAMTS13 permiten la producción de al menos o aproximadamente 800 U//d. En otras realizaciones, los procedimientos de expresión de ADAMTS13 permiten la producción de al menos o aproximadamente 900 U//d. En otras realizaciones, los procedimientos de expresión de ADAMTS13 permiten la producción de al menos o aproximadamente 1000 U//d. En otras realizaciones, los procedimientos de expresión de ADAMTS13 permiten la producción de al menos o aproximadamente 1100 U//d. En otras realizaciones, los procedimientos de expresión de ADAMTS13 permiten la producción de al menos o aproximadamente 1200 U//d. En otras realizaciones, los procedimientos de expresión de ADAMTS13 permiten la producción de al menos o aproximadamente 1300 U//d. En otras realizaciones, los procedimientos de expresión de ADAMTS13 permiten la producción de al menos o aproximadamente 1400 U//d. En otras realizaciones, los procedimientos de expresión de ADAMTS13 permiten la producción de al menos o aproximadamente 1500 U//d. Aún en otras realizaciones, los procedimientos de expresión de ADAMTS13 permiten la producción de al menos o aproximadamente 2000 U//d. En algunas realizaciones, los cultivos pueden realizarse como cultivos discontinuos en suspensión. En otras realizaciones, los cultivos pueden realizarse como cultivos discontinuos adherentes. En determinadas realizaciones,

el medio puede ser un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En otra realización, los procedimientos permiten la expresión ampliada de la proteína ADAMTS13 con actividades específicas altas, por ejemplo, una actividad específica de proteína A13 de al menos aproximadamente 600 U/mg, o de proteína A13 de al menos aproximadamente 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000 o más U/mg durante un periodo de tiempo prolongado. En determinadas realizaciones, el cultivo se mantiene durante al menos 7 días, o al menos 14 días, 21 días, 28 días, o al menos 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, o al menos 2 meses, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses o más. En algunas realizaciones, los cultivos pueden realizarse como cultivos discontinuos en suspensión. En otras realizaciones, los cultivos pueden realizarse como cultivos discontinuos adherentes. En determinadas realizaciones, el medio puede ser un medio libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

3. Condiciones de cultivo

Sorprendentemente, también se ha encontrado que las viabilidades celulares y las actividades de ADAMTS13 pueden aumentarse mediante pequeñas variaciones en la temperatura y el pH del cultivo celular. Tal como puede observarse en la figura 2, la actividad específica de ADAMTS13 expresada se mejora enormemente cuando se cultivan células que albergan un nucleótido que codifica una proteína ADAMTS13 a un pH por debajo de aproximadamente 7,30. La temperatura, aunque en un grado menor, también es un factor que contribuye a la actividad de ADAMTS13 específica en estos estudios. De manera similar, se encontró que la productividad volumétrica de A13 (medida mediante FRETS-VWF73) en los sobrenadantes de cultivos cultivados a un pH de entre aproximadamente 6,80 y aproximadamente 7,3 aumentaba enormemente en comparación con niveles de pH por encima y por debajo de ese intervalo. La productividad de ADAMTS13 también resultaba afectada por la temperatura del cultivo. Se encontró actividad máxima en cultivos cultivados a temperatura de entre aproximadamente 34 °C y aproximadamente 37 °C.

En otras realizaciones, los procedimientos de expresión de la proteína ADAMTS comprenden una etapa de mantenimiento de la temperatura del medio de cultivo a una temperatura de aproximadamente 34 °C y aproximadamente 37 °C. En determinadas realizaciones, el medio de cultivo puede mantenerse a una temperatura de 36,5 °C o menos, 36,0° o menos, 35,5 °C o menos, o menos de 35,0 °C. En una realización específica, la temperatura se mantiene a una temperatura de aproximadamente 36 °C. En una realización específica el cultivo se mantiene a una combinación de los intervalos de temperatura y pH mencionados anteriormente, por ejemplo 36,5 °C o menos y a un pH por ejemplo de 7,15 o menos. En una realización preferente, el cultivo se mantiene a una temperatura de 36,0 °C y a un pH de 7,10.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, los procedimientos de expresión de la proteína ADAMTS comprenden una etapa de mantenimiento del pH del medio de cultivo a un pH de entre aproximadamente 6,8 y 7,3. En determinadas realizaciones, el pH puede ser de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,25 o de entre aproximadamente 7,05 y aproximadamente 7,15. En determinadas realizaciones el pH puede mantenerse a un pH de 7,20 o menos, 7,15 o menos, 7,10 o menos o 7,05 o menos. En una realización específica, el pH del medio de cultivo se mantiene a un pH de aproximadamente 7,1.

En una realización, la invención proporciona un procedimiento para la expresión de una proteína ADAMTS que comprende cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) a una temperatura de o aproximadamente de entre 34 °C y aproximadamente 37 °C a un pH de o aproximadamente de entre 6,8 y 7,3. En otra realización, la temperatura del cultivo será de o aproximadamente de entre 35 °C y aproximadamente 37 °C y el pH será de o aproximadamente de entre 6,8 y 7,3. En otra realización, la temperatura del cultivo será de o aproximadamente de entre 35,5 °C y aproximadamente 36,5 °C y el pH será de o aproximadamente de entre 6,8 y 7,3. En otra realización, la temperatura del cultivo será de o aproximadamente de 36 °C y el pH será de o aproximadamente de entre 6,8 y 7,3. En una realización, el medio de cultivo se complementará con cinc. En otra realización específica, el medio de cultivo se complementará con calcio. En otra realización específica, el medio de cultivo se complementará con nicotinamida (vitamina B3). En una realización, el medio de cultivo se complementará con cinc y calcio. En una realización, las concentraciones de cinc y calcio serán una de Var. 94 a Var. 113 (tabla 7). En otra realización, el medio de cultivo se complementará con cinc y nicotinamida (vitamina B3). En una realización, las concentraciones de cinc y nicotinamida (vitamina B3) serán una de Var. 114 a Var. 133 (tabla 8). En otra realización, el medio de cultivo se complementará con calcio y nicotinamida (vitamina B3). En una realización, las concentraciones de calcio y nicotinamida (vitamina B3) serán una de Var. 134 a Var. 149 (tabla 9). Aún en otra realización, el medio de cultivo se concentrará con cinc, calcio y nicotinamida (vitamina B3). En una realización, las concentraciones de cinc, calcio y nicotinamida (vitamina B3) serán una de Var. 14 a Var. 93 (tabla 3 a tabla 6).

En otra realización, la invención proporciona un procedimiento para la expresión de una proteína ADAMTS que comprende cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) a una temperatura de o aproximadamente de entre 34 °C y aproximadamente 37 °C a un pH de o

aproximadamente de entre 6,9 y 7,25. En otra realización, la temperatura del cultivo será de o aproximadamente de entre 35 °C y aproximadamente 37 °C y el pH será de o aproximadamente de entre 6,9 y 7,25. En otra realización, la temperatura del cultivo será de o aproximadamente de entre 35,5 °C y aproximadamente 36,5 °C y el pH será de o aproximadamente de entre 6,9 y 7,25. En otra realización, la temperatura del cultivo será de o aproximadamente de entre 36 °C y el pH será de o aproximadamente de entre 6,9 y 7,25. En una realización, el medio de cultivo se complementará con cinc. En otra realización específica, el medio de cultivo se complementará con calcio. En otra realización específica, el medio de cultivo se complementará con nicotinamida (vitamina B3). En una realización, el medio de cultivo se complementará con cinc y calcio. En una realización, las concentraciones de cinc y calcio serán una de Var. 94 a Var. 113 (tabla 7). En otra realización, el medio de cultivo se complementará con cinc y nicotinamida (vitamina B3). En una realización, las concentraciones de cinc y nicotinamida (vitamina B3) serán una de Var. 114 a Var. 133 (tabla 8). En otra realización, el medio de cultivo se complementará con calcio y nicotinamida (vitamina B3). En una realización, las concentraciones de calcio y nicotinamida (vitamina B3) serán una de Var. 134 a Var. 149 (tabla 9). Aún en otra realización, el medio de cultivo se concentrará con cinc, calcio y nicotinamida (vitamina B3). En una realización, las concentraciones de cinc, calcio y nicotinamida (vitamina B3) serán una de Var. 14 a Var. 93 (tabla 3 a tabla 6).

En otra realización, la invención proporciona un procedimiento para la expresión de una proteína ADAMTS que comprende cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) a una temperatura de o aproximadamente de entre 34 °C y aproximadamente 37 °C a un pH de o aproximadamente entre 7,0 y 7,20. En otra realización, la temperatura del cultivo será de o aproximadamente de entre 35 °C y aproximadamente 37 °C y el pH será de o aproximadamente de entre 7,0 y 7,20. En otra realización, la temperatura del cultivo será de o aproximadamente de entre 35,5 °C y aproximadamente 36,5 °C y el pH será de o aproximadamente de entre 7,0 y 7,20. En otra realización, la temperatura del cultivo será de o aproximadamente de entre 36 °C y el pH será de o aproximadamente de entre 7,0 y 7,20. En una realización, el medio de cultivo se complementará con cinc. En otra realización específica, el medio de cultivo se complementará con calcio. En otra realización específica, el medio de cultivo se complementará con nicotinamida (vitamina B3). En una realización, el medio de cultivo se complementará con cinc y calcio. En una realización, las concentraciones de cinc y calcio serán una de Var. 94 a Var. 113 (tabla 7). En otra realización, el medio de cultivo se complementará con cinc y nicotinamida (vitamina B3). En una realización, las concentraciones de cinc y nicotinamida (vitamina B3) serán una de Var. 114 a Var. 133 (tabla 8). En otra realización, el medio de cultivo se complementará con calcio y nicotinamida (vitamina B3). En una realización, las concentraciones de calcio y nicotinamida (vitamina B3) serán una de Var. 134 a Var. 149 (tabla 9). Aún en otra realización, el medio de cultivo se concentrará con cinc, calcio y nicotinamida (vitamina B3). En una realización, las concentraciones de cinc, calcio y nicotinamida (vitamina B3) serán una de Var. 14 a Var. 93 (tabla 3 a tabla 6).

El concepto de crecimiento celular sobre microvehículos los describió por primera vez van Wezel (van Wezel AL., *Nature*, 7 de octubre de 1967;216(5110):64-5) y permite la unión celular sobre la superficie de pequeñas partículas sólidas suspendidas en el medio de crecimiento. Estos procedimientos proporcionan altas razones de superficie con respecto a volumen y, por tanto, permiten la utilización eficaz de nutrientes. Además, para la expresión de proteínas secretadas en líneas celulares eucariotas, la razón aumentada de superficie con respecto a volumen permite niveles de secreción superiores y por tanto rendimientos de proteína superiores en el sobrenadante del cultivo. Finalmente, estos procedimientos permiten la ampliación a escala fácil de cultivos de expresión en eucariotas.

Las células que expresan una proteína ADAMTS pueden unirse a un microvehículo esférico o poroso durante el crecimiento del cultivo celular. El microportador puede ser un microvehículo seleccionado del grupo de microvehículos 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). Por tanto, según una realización de la invención, las células que expresan una proteína ADAMTS se cultivan en microvehículos esféricos. Según otra realización de la invención, las células que expresan una proteína ADAMTS se cultivan sobre microvehículos porosos. También es posible hacer crecer las células hasta una biomasa sobre microvehículos 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 microvehículos esféricos son aquellos seleccionados del grupo de superficie lisa tales como Cytodex™ 1, Cytodex™ 2, y Cytodex™ 3 (GE Healthcare) y microvehículos macroporosos tales como Cytopore™ 1, Cytopore™ 2, Cytoline™ 1, y Cytoline™ 2 (GE Healthcare).

IV. Medios de cultivo

En un aspecto, la presente invención proporciona medios de cultivo que son útiles para la expresión de proteínas ADAMTS que tienen actividades específicas altas. Ventajosamente, se ha encontrado que complementando un medio de cultivo con diversos componentes, tales como combinaciones de cinc, calcio y nicotinamida (vitamina B3), las actividades de enzimas ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) expresadas en células cultivadas en el medio se potencian enormemente, mientras que las enzimas se expresan a niveles tan altos, si no superiores, que las células cultivadas en medios no complementados.

Se conocen en la técnica procedimientos de preparación de medios de cultivo definidos químicamente, por ejemplo en las patentes estadounidenses números 6.171.825 y 6.936.441, WO 2007/077217, y las publicaciones de solicitud de patente estadounidense números 2008/0009040 y 2007/0212770. En una realización, el medio de cultivo usado

en los procedimientos descritos en el presente documento es 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 puede contener al menos una poliamina a una concentración de aproximadamente 0,5 mg/l to aproximadamente 10 mg/l.

5 Por consiguiente, en una realización, se proporciona un medio de cultivo que está complementado con calcio, cinc y/o vitamina B3 adicional. 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, WO 2007/077217, y las publicaciones de solicitud estadounidense números 2008/0009040 y 10 2007/0212770, y se complementa con calcio, cinc y/o vitamina B3 adicional. En una realización específica, el medio de cultivo definido químicamente puede ser similar a un medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), que se ha complementado con calcio, cinc y/o vitamina B3 adicional, con el fin de aumentar la actividad específica de una proteína ADAMTS expresada 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 proteína, por ejemplo, proteína animal de suero tal como suero de ternera fetal. En otra realización, el cultivo tiene proteínas recombinantes añadidas de manera exógena. En otra realización, las proteínas son de un animal libre de patógenos certificado.

20 En determinadas realizaciones, los medios de cultivo contienen al menos una poliamina a una concentración de a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo contiene al menos una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 10 mg/l. En una realización, el medio de cultivo contiene al menos una poliamina a o aproximadamente a 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 preferente, la poliamina es putrescina. En una realización específica, el medio de cultivo contiene o contiene aproximadamente entre 2 mg/l y 8 mg/l de putrescina.

25 En una realización, un medio de cultivo se proporciona para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que contiene cinc al menos o aproximadamente 2 μ M. En otra realización, el medio de cultivo contiene cinc al menos o aproximadamente 5 μ M. En una realización, el medio de cultivo contiene cinc a o aproximadamente a entre 2 μ M y 12 μ M. En otra realización, el medio de cultivo contiene cinc a o aproximadamente a entre 5 μ M y 12 μ M. Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo puede contener cinc al menos o aproximadamente 2 μ M, o al menos o aproximadamente 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 6 μ M, 7 μ M, 8 μ M, 9 μ M, 10 μ M, 11 μ M, 12 μ M, en determinados aspectos comparativos 13 μ M, 14 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M, 30 μ M o más.

30 35 Generalmente, puede usarse cualquier sal de cinc para complementar los medios de la invención, los ejemplos no limitativos de sales aceptables incluyen $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2\text{Zn}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 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 de la invención. En otras realizaciones, puede usarse una preparación de péptido o proteína que contiene cinc, por ejemplo insulina, para complementar el cultivo proporcionado en el presente documento.

40 45 En otra realización, se proporciona un medio de cultivo para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que contiene calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM. En otra realización, el medio de cultivo contiene calcio al menos o aproximadamente 1,5 mM. En una realización, el medio de cultivo contiene calcio a o aproximadamente a entre 0,5 mM y 1,5 mM. Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo puede contener calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM, o al menos 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.

50 55 Generalmente, puede usarse cualquier sal de calcio para complementar los medios de la invención, los ejemplos no limitativos de sales aceptables incluyen 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 de la invención.

60 65 En otra realización, se proporciona un medio de cultivo para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que contiene nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 2 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo contiene nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 7 mg/l. En una realización, el medio de cultivo contiene nicotinamida (vitamina B3) a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 10 mg/l. Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo puede contener nicotinamida (vitamina B3) al menos 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 superiores

Ventajosamente, se ha encontrado que complementando un medio de cultivo tanto con cinc como con calcio, la actividad específica de la proteína ADAMTS13 expresada en el medio de cultivo aumenta enormemente. Por consiguiente, en una realización, los medios de cultivo proporcionados en el presente documento para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) pueden complementarse tanto con cinc como con calcio. Por

ejemplo, un medio de cultivo puede complementarse con cinc y calcio a niveles proporcionados en la tabla 7, es decir, a un nivel según una cualquiera de Var. 94 a Var. 113.

5 Tabla 7. Realizaciones a modo de ejemplo de medios de cultivos complementados tanto con cinc como con calcio, que son útiles para la expresión de una proteína ADAMTS13.

	Calcio al menos 0,5 mM	Calcio al menos 1,5 mM	Calcio entre 0,5 mM y 1,5 mM	Calcio 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
Cinc al menos 2 μ M	Var. 94	Var. 95	Var. 96	Var. 97
Cinc al menos 5 μ M	Var. 98	Var. 99	Var. 100	Var. 101
Cinc entre 2 μ M y 12 μ M	Var. 102	Var. 103	Var. 104	Var. 105
Cinc entre 5 μ M y 12 μ M	Var. 106	Var. 107	Var. 108	Var. 109
Cinc al menos 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 6 μ M, 7 μ M, 8 μ M, 9 μ M, 10 μ M, 11 μ M, 12 μ M, y en determinados aspectos comparativos 13 μ M, 14 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M, 30 μ M, o más	Var. 110	Var. 111	Var. 112	Var. 113

*Var. = Variación

10 De manera similar, se ha encontrado que complementando un medio de cultivo tanto con cinc como con nicotinamida (vitamina B3), la actividad específica de proteína ADAMTS13 expresada en el medio de cultivo aumenta sinérgicamente. Por ejemplo, este efecto puede observarse en el ejemplo 2 (compárese la tabla 14 día 11 con la tabla 13 días 4 y 7). Por consiguiente, en una realización, los medios de cultivo proporcionados en el presente documento para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) pueden complementarse tanto con cinc como con nicotinamida (vitamina B3). Por ejemplo, un medio de cultivo puede complementarse con cinc y nicotinamida (vitamina B3) a niveles proporcionados en la tabla 8, es decir, a un nivel según una cualquiera de Var. 114 a Var. 133.

15 Tabla 8. Realizaciones a modo de ejemplo de medios de cultivo complementados tanto con cinc como con nicotinamida (vitamina B3), que son útiles para la expresión de una proteína ADAMTS13.

	Nicotinamida al menos 2 mg/l	Nicotinamida al menos 7 mg/l	Nicotinamida entre 2 mg/l y 7 mg/l	Nicotinamida al menos 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 más
Cinc al menos 2 μ M	Var. 114	Var. 115	Var. 116	Var. 117
Cinc al menos 5 μ M	Var. 118	Var. 119	Var. 120	Var. 121
Cinc entre 2 μ M y 12 μ M	Var. 122	Var. 123	Var. 124	Var. 125
Cinc entre 5 μ M y 12 μ M	Var. 126	Var. 127	Var. 128	Var. 129
Cinc al menos 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 6 μ M, 7 μ M, 8 μ M, 9 μ M, 10 μ M, 11 μ M, 12 μ M, y en determinados aspectos comparativos 13 μ M, 14 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M, 30 μ M, o más	Var. 130	Var. 131	Var. 132	Var. 133

Var. = Variación

20 Ventajosamente, se ha encontrado que complementando un medio de cultivo tanto con nicotinamida como con calcio, la actividad específica de la proteína ADAMTS13 expresada en el medio de cultivo aumenta enormemente. Por consiguiente, en una realización, los medios de cultivo proporcionados en el presente documento para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) pueden complementarse tanto con nicotinamida (vitamina B3) como con calcio. Por ejemplo, un medio de cultivo puede complementarse con nicotinamida (vitamina B3) y calcio a niveles proporcionados en la tabla 9, es decir, a un nivel según una cualquiera de Var. 134 a Var. 149.

Tabla 9. Realizaciones a modo de ejemplo de medios de cultivo complementados tanto con nicotinamida (vitamina B3) como con calcio, que son útiles para la expresión de una proteína ADAMTS13.

	Nicotinamida al menos 2 mg/l	Nicotinamida al menos 7 mg/l	Nicotinamida entre 2 mg/l y 7 mg/l	Nicotinamida al menos 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 más
Calcio al menos 0,5 mM	Var. 134	Var. 135	Var. 136	Var. 137
Calcio al menos 1,5 mM	Var. 138	Var. 139	Var. 140	Var. 141
Calcio entre 0,5 mM y 1,5 mM	Var. 142	Var. 143	Var. 144	Var. 145
Calcio 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	Var. 146	Var. 147	Var. 148	Var. 149

5 Var. = Variación

10 En algunas realizaciones, el medio de cultivo proporcionado por la invención puede proporcionarse en una forma líquida o seca o de polvo. El medio puede alicuotarse previamente en una cantidad adecuada para uso individual o proporcionarse en una cantidad mayor que puede usarse para más de un cultivo celular. Generalmente, el medio de la invención se proporcionará de una manera estéril. Por consiguiente, la presente invención también proporciona kits para la expresión o producción de una proteína ADAMTS13, comprendiendo los kits un medio de cultivo adecuado para la expresión de una proteína ADAMTS que tiene actividad específica alta.

15 En un aspecto, la presente invención proporciona medios de cultivo útiles para la expresión de proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) con actividades específicas altas. En una realización, el medio de cultivo contiene cinc al menos aproximadamente 2 µM. En otra realización, el medio de cultivo contiene cinc entre aproximadamente 2 µM y aproximadamente 12 mM. Aún en otra realización, el medio de cultivo contiene cinc al menos aproximadamente 5 µM. En una realización, el medio de cultivo contiene cinc entre aproximadamente 5 µM y aproximadamente 12 µM. En otra realización, el medio de cultivo contiene calcio al menos aproximadamente 0,5 mM. Aún en otra realización, el medio de cultivo contiene calcio entre aproximadamente 0,5 mM y aproximadamente 1,5 mM. En una realización, el medio de cultivo contiene cinc al menos aproximadamente 2 µM y calcio al menos aproximadamente 0,5 mM.

25 Aún en otras realizaciones, se ha encontrado que la adición de nicotinamida (vitamina B3) potencia adicionalmente la expresión y la actividad específica de las proteínas ADAMTS en cultivo celular. En una realización, el medio de cultivo comprende además nicotinamida (vitamina B3) al menos aproximadamente 2 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además nicotinamida (vitamina B3) al menos aproximadamente 7 mg/l. Aún en otra realización, el medio de cultivo contiene nicotinamida (vitamina B3) entre aproximadamente 2 mg/l y aproximadamente 10 mg/l.

30 En determinadas realizaciones, el medio de cultivo es un medio de cultivo libre de proteínas animales. En otra realización, el medio de cultivo es un medio definido químicamente. En determinadas realizaciones, el medio de cultivo puede comprender una o más poliaminas. En una realización particular, la poliamina es putrescina, por ejemplo, a una concentración de al menos 0,5 mg/l. En una realización específica, el medio de cultivo contiene putrescina entre aproximadamente 2 mg/l y aproximadamente 8 mg/l.

35 1. Medios de cultivo libres de proteínas

40 En determinados aspectos, la presente invención proporciona medios de cultivo para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13), que están libres de proteína añadida de manera exógena. "Medio de cultivo libre de proteínas" y términos relacionados se refiere un medio de cultivo que carece de proteína que es de una fuente exógena a o distinta de las células en el cultivo, que liberan de manera natural proteínas durante el crecimiento. En una realización, se proporciona un medio de cultivo para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13), que está libre de proteína añadida de manera exógena (es decir, libre de proteína) y se complementa con cinc, calcio y/o nicotinamida (vitamina B3). En determinadas realizaciones, el medio de cultivo libre de proteínas contiene una poliamina. Por ejemplo, a una concentración de al menos 2 mg/l, o a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 30 mg/l, o a o aproximadamente entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina. Se enseñan medios de cultivo libres de proteínas a modo de ejemplo en las patentes estadounidenses números 6.171.825 y 6.936.441, WO 2007/077217, y las publicaciones de solicitud estadounidense números 2008/0009040 y 2007/0212770.

50

En una realización, se proporciona un medio de cultivo libre de proteínas para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que contiene cinc al menos o aproximadamente 2 μM , cinc al menos o aproximadamente 5 μM , cinc a o aproximadamente a entre 2 μM y 12 μM , o cinc a o aproximadamente a entre 5 μM y 12 μM . Aún en otras realizaciones, se proporciona un medio de cultivo libre de proteínas para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que contiene cinc al menos o aproximadamente 3 μM , 4 μM , 5 μM , 6 μM , 7 μM , 8 μM , 9 μM , 10 μM , 11 μM , 12 μM , en determinados aspectos comparativos 13 μM , 14 μM , 15 μM , 20 μM , 25 μM , 30 μM o más.

En otra realización, se proporciona un medio de cultivo libre de proteínas para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que contiene calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM, calcio al menos o aproximadamente 1,5 mM, o calcio a o aproximadamente a entre 0,5 y 1,5 mM. Aún en otras realizaciones, se proporciona un medio de cultivo libre de proteínas para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que contiene calcio al menos 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.

Aún en otra realización, se proporciona un medio de cultivo libre de proteínas para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que contiene nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 2 mg/l, nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 7 mg/l, o nicotinamida (vitamina B3) a o aproximadamente a entre 2 mg/l. Aún en otras realizaciones, se proporciona un medio de cultivo libre de proteínas para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que contiene nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 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 más.

2. Medios de cultivo libres de oligopéptidos

En determinados aspectos, la presente invención proporciona medios de cultivo para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13), que están libres de oligopéptidos añadidos de manera exógena. En una realización, se proporciona un medio de cultivo para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13), que está libre de oligopéptidos añadidos de manera exógena (es decir, libre de polipéptidos) y se complementa con cinc, calcio y/o nicotinamida (vitamina B3). En determinadas realizaciones, el medio de cultivo libre de oligopéptidos contiene una poliamina. Por ejemplo, a una concentración de al menos 2 mg/l, o a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 30 mg/l, o a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina. Se enseñan medios de cultivo libres de oligopéptidos a modo de ejemplo en las patentes estadounidenses números 6.171.825 y 6.936.441, WO 2007/077217, y las publicaciones de solicitud estadounidense números 2008/0009040 y 2007/0212770.

En una realización, se proporciona un medio de cultivo libre de oligopéptidos para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que contiene cinc al menos o aproximadamente 2 μM , cinc al menos o aproximadamente 5 μM , a o cinc aproximadamente a entre 2 μM y 12 μM , o cinc a o aproximadamente a entre 5 μM y 12 μM . Aún en otras realizaciones, se proporciona un medio de cultivo libre de oligopéptidos para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que contiene cinc al menos o aproximadamente 3 μM , 4 μM , 5 μM , 6 μM , 7 μM , 8 μM , 9 μM , 10 μM , 11 μM , 12 μM , en determinados aspectos comparativos 13 μM , 14 μM , 15 μM , 20 μM , 25 μM , 30 μM o más.

En otra realización, se proporciona un medio de cultivo libre de oligopéptidos para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que contiene calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM, calcio al menos o aproximadamente 1,5 mM, o calcio a o aproximadamente a entre 0,5 y 1,5 mM. Aún en otras realizaciones, se proporciona un medio de cultivo libre de oligopéptidos para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que contiene calcio al menos 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.

Aún en otra realización, se proporciona un medio de cultivo libre de oligopéptidos para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que contiene nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 2 mg/l, nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 7 mg/l, o nicotinamida (vitamina B3) a o aproximadamente a entre 2 mg/l. Aún en otras realizaciones, se proporciona un medio de cultivo libre de oligopéptidos para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que contiene nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 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 más.

3. Medios de cultivo libres de suero

En determinados aspectos, la presente invención proporciona medios de cultivo para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13), que están libres de suero. En una realización, se proporciona un medio de cultivo para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13), que está libre de suero añadido de manera exógena (es decir, libre de suero) y se complementa con cinc, calcio y/o nicotinamida (vitamina B3). En

determinadas realizaciones, el medio de cultivo libre de suero contiene una poliamina. Por ejemplo, a una concentración de al menos 2 mg/l, o a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 30 mg/l, o a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina. Se enseñan medios de cultivo libres de suero a modo de ejemplo en las patentes estadounidenses números 6.171.825 y 6.936.441, WO 2007/077217, y las publicaciones de solicitud estadounidense números 2008/0009040 y 2007/0212770.

En una realización, se proporciona un medio de cultivo libre de suero para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que contiene cinc al menos o aproximadamente 2 μ M, cinc al menos o aproximadamente 5 μ M, cinc a o aproximadamente a entre 2 μ M y 12 μ M, o cinc a o aproximadamente a entre 5 μ M y 12 μ M. Aún en otras realizaciones, se proporciona un medio de cultivo libre de suero para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que contiene cinc al menos o aproximadamente 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 6 μ M, 7 μ M, 8 μ M, 9 μ M, 10 μ M, 11 μ M, 12 μ M, en determinados aspectos comparativos 13 μ M, 14 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M, 30 μ M o más.

En otra realización, se proporciona un medio de cultivo libre de suero para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que contiene calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM, calcio al menos o aproximadamente 1,5 mM, o calcio a o aproximadamente a entre 0,5 y 1,5 mM. Aún en otras realizaciones, se proporciona un medio de cultivo libre de suero para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que contiene calcio al menos 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.

Aún en otra realización, se proporciona un medio de cultivo libre de suero para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que contiene nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 2 mg/l, nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 7 mg/l, o a o aproximadamente a entre nicotinamida (vitamina B3) 2 mg/l. Aún en otras realizaciones, se proporciona un medio de cultivo libre de suero para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que contiene nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 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 más.

4. Medios de cultivo libres de proteínas animales

En determinados aspectos, la presente invención proporciona medios de cultivo para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13), que están libres proteínas animales. En una realización, se proporciona un medio de cultivo para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13), que está libre de polipéptidos o proteínas animales añadidos de manera exógena (es decir, libre de proteínas animales) y se complementa con cinc, calcio y/o nicotinamida (vitamina B3). En determinadas realizaciones, el medio de cultivo libre de proteínas animales contiene una poliamina. Por ejemplo, a una concentración de al menos 2 mg/l, o a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 30 mg/l, o a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina. Se enseñan medios de cultivo libres de proteínas animales en las patentes estadounidenses números 6.171.825 y 6.936.441, WO 2007/077217, y las publicaciones de solicitud estadounidense números 2008/0009040 y 2007/0212770.

En una realización, se proporciona un medio de cultivo libre de proteínas animales para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que contiene cinc al menos o aproximadamente 2 μ M, cinc al menos o aproximadamente 5 μ M, cinc a o aproximadamente entre 2 μ M y 12 μ M, cinc o a o aproximadamente entre 5 μ M y 12 μ M. Aún en otras realizaciones, se proporciona un medio de cultivo libre de proteínas animales para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que contiene cinc al menos o aproximadamente 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 6 μ M, 7 μ M, 8 μ M, 9 μ M, 10 μ M, 11 μ M, en determinados aspectos comparativos 12 μ M, en determinados aspectos comparativos 13 μ M, 14 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M, 30 μ M o más.

En otra realización, se proporciona un medio de cultivo libre de proteínas animales para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que contiene calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM, calcio al menos o aproximadamente 1,5 mM, o calcio a o aproximadamente a entre 0,5 y 1,5 mM. Aún en otras realizaciones, se proporciona un medio de cultivo libre de proteínas animales para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que contiene calcio al menos 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.

Aún en otra realización, se proporciona un medio de cultivo libre de proteínas animales para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que contiene nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 2 mg/l, nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 7 mg/l, o nicotinamida (vitamina B3) a o aproximadamente a entre 2 mg/l. Aún en otras realizaciones, se proporciona un medio de cultivo libre de proteínas animales para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que contiene nicotinamida (vitamina B3) al menos o aproximadamente 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 más.

V. Purificación de la proteína ADAMTS

5 Se secreta ADAMTS13 al plasma *in vivo*, donde funciona regulando la actividad de coagulación escindiendo multímeros grandes de vWF. La capacidad de las células de mamífero para secretar ADAMTS13 tras la expresión puede aprovecharse durante la producción y purificación de composiciones de ADAMTS13 en cultivo celular. Por ejemplo, expresando ADAMTS13 recombinante en cultivo de células de mamífero, pueden recuperarse fácilmente composiciones de ADAMTS13 directamente del sobrenadante de cultivo sin la necesidad de recoger y lisar las células. Esto permite el uso de técnicas tales como cultivo celular continuo (por ejemplo, cultivo celular quimiostáticos o en perfusión) para producir grandes cantidades de la proteína sin múltiples periodos de demora y recuperación del cultivo. En un aspecto de la invención, se proporcionan procedimientos para la purificación de proteínas ADAMTS que tienen una actividad específica alta del cultivo celular.

15 Por consiguiente, en una realización, se expresan proteínas ADAMTS13 en cultivo y se recuperan directamente del sobrenadante de cultivo. De este modo, se recuperan proteínas ADAMTS13 retirando una fracción del cultivo y purificando ADAMTS13 de los otros componentes del sobrenadante. Generalmente, esto implica separar cualquier célula que se recupere junto con el sobrenadante mediante filtración o centrifugación y someter el sobrenadante a una o más etapas de purificación de ADAMTS13.

20 La publicación de solicitud de patente estadounidense número 2005/0266528 y Zheng y col.,(2001, *Blood*, 98:1662-1666) proporcionan procedimientos a modo de ejemplo para purificar ADAMTS13. Puede formularse ADAMTS13 purificada según procedimientos convencionales y usarse terapéuticamente, por ejemplo, para tratar la PTT.

25 En un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para producir una composición de proteína ADAMTS (por ejemplo, una composición de ADAMTS13). En una primera realización, el procedimiento comprende las etapas de: (a) cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS en un medio de cultivo libre de proteínas animales; (b) retirar una fracción del sobrenadante del cultivo; (c) realizar una etapa de filtración o centrifugación para retirar cualquier célula residual; (d) realizar una etapa de ultrafiltración para concentrar la proteína ADAMTS; y (e) realizar una etapa de diafiltración con un tampón que comprende cinc al menos aproximadamente 0,5 μM y calcio al menos aproximadamente 0,1 mM; preparando de ese modo una composición de ADAMTS.

35 En determinadas realizaciones, la etapa de cultivar una célula comprende cultivo celular discontinuo. En otras realizaciones, la etapa de cultivar una célula comprende cultivo celular continuo.

40 En determinadas realizaciones, el medio de cultivo contiene calcio. En una realización específica, el medio de cultivo contiene calcio al menos 0,5 mM. En otras realizaciones, el medio de cultivo contiene cinc. En una realización específica, el medio de cultivo contiene cinc al menos 2 μM . Aún en otras realizaciones, el medio de cultivo contiene nicotinamida (vitamina B3). En una realización específica, el medio de cultivo contiene nicotinamida (vitamina B3) al menos 2 mg/l. En determinadas realizaciones, el tampón de diafiltración contiene cinc al menos aproximadamente 5 μM y calcio al menos aproximadamente 2 mM.

45 En determinadas realizaciones, se pierde menos de aproximadamente el 20 % de la actividad de ADAMTS13 específica entre el final de la etapa (c) y el final de la etapa (e). En otras realizaciones, se pierde menos de aproximadamente el 10 % de la actividad de ADAMTS13 específica entre el final de la etapa (c) y el final de la etapa (e). Aún en otras realizaciones, la composición de ADAMTS13 tiene una actividad específica de al menos aproximadamente 1.000 U/mg. En otra realización, la composición de ADAMTS13 tiene una actividad específica de al menos aproximadamente 1.500 U/mg.

50 A. Intercambio de tampón

Normalmente, cuando se purifica una proteína secretada de un sobrenadante de cultivo, la primera etapa del procedimiento de purificación implica intercambiar el medio de cultivo por una solución tamponada, lo que facilita la purificación adicional de la proteína de interés. Existen varias opciones para intercambiar el medio de cultivo por un tampón, incluyendo sin limitación, diafiltración, diálisis, técnicas de intercambio de tampón, filtración en gel, cromatografía, y similares.

60 Se encontró que composiciones de proteína ADAMTS13 pierden una fracción significativa de su actividad específica durante tales etapas de purificación que requieren la introducción de nuevos tampones, por ejemplo, diafiltración, diálisis, intercambio de tampón, cromatografía, y etapas similares, independientemente de la duración de tiempo entre la recogida del sobrenadante del cultivo y la etapa de purificación. Sin embargo, ventajosamente, los presentes inventores han descubierto que incluyendo cinc y calcio en el tampón que está introduciéndose en el sistema, tal como en diafiltración, diálisis, intercambio de tampón, filtración en gel y etapas cromatográficas, se conservan las actividades específicas altas de la composición de ADAMTS13. Como prueba de esto, el ejemplo 6 demuestra que la diafiltración de una composición de ADAMTS13 con un tampón que carece de calcio y cinc da como resultado una pérdida promedio de casi el 25 % de la actividad específica de la composición, mientras que la inclusión de calcio y

cinc casi previene totalmente esta pérdida (tabla 22). Por consiguiente, la presente invención proporciona procedimientos para reducir la pérdida de actividad para una composición de proteína ADAMTS tras la diafiltración, o procedimientos similares, por ejemplo, diálisis, intercambio de tampón, cromatografía, mediante la inclusión de cinc y calcio en el sistema de tampón.

En una realización, se proporciona un procedimiento para purificar una composición de proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13), comprendiendo el procedimiento las etapas de (a) cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un medio de cultivo; (b) recuperar una parte del sobrenadante del medio de cultivo que contiene una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13); y (c) intercambiar el sobrenadante del medio de cultivo por una solución tamponada que contiene cinc y calcio, preparando de ese modo una composición de proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13). En una realización, el medio de cultivo contiene cinc, calcio y opcionalmente nicotinamida (vitamina B3). En una realización preferente, la etapa de cultivar una célula comprende un cultivo continuo (por ejemplo, cultivo quimiostático o en perfusión). En otra realización preferente, el cultivo se mantiene a una temperatura de entre 34 °C y 37 °C. Aún en otra realización preferente, el cultivo se mantiene a un pH de entre 6,9 y 7,2.

En una realización específica, la etapa de intercambiar el sobrenadante del medio de cultivo por una solución tamponada comprende el uso de un tampón que contiene calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM y cinc al menos o aproximadamente 0,5 μM. En otra realización, el tampón contiene calcio al menos o aproximadamente 2 mM y cinc al menos o aproximadamente 5 μM. En determinadas realizaciones, la concentración de calcio puede ser calcio al menos aproximadamente 0,1 mM, 0,3 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 3 mM, 5 mM o más. En determinadas realizaciones, la concentración de cinc puede ser cinc al menos aproximadamente 0,5 μM, 1 μM, 2 μM, 3 μM, 5 μM, 10 μM o más. Generalmente, cualquier combinación de las concentraciones anteriores es adecuada para su uso en los presentes procedimientos.

En una realización, se proporciona un procedimiento para el intercambio de tampón de una composición de proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) realizando el intercambio de tampón (por ejemplo, diafiltración, diálisis, filtración en gel, etc.) con un tampón que contiene calcio y cinc. En una realización específica, el procedimiento comprende el uso de un tampón que contiene calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM y cinc al menos o aproximadamente 0,5 μM. En otra realización, el tampón contiene calcio al menos o aproximadamente 1 mM y cinc al menos o aproximadamente 1 μM. En una realización, el tampón contiene calcio al menos o aproximadamente 2 mM y cinc al menos o aproximadamente 2 μM. En otra realización, el tampón contiene calcio al menos o aproximadamente 2 mM y cinc al menos o aproximadamente 5 μM. Aún en otras realizaciones, el tampón contiene calcio entre 0,5 mM y 5 mM y cinc entre 0,5 μM y 5 μM. En determinadas realizaciones, la concentración de calcio puede ser calcio al menos aproximadamente 0,1 mM, 0,3 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 3 mM, 5 mM o más. En determinadas realizaciones, la concentración de cinc puede ser cinc al menos aproximadamente 0,5 μM, 1 μM, 2 μM, 3 μM, 5 μM, 10 μM o más. En una realización determinada la cosecha, el sobrenadante libre de células o el tampón de diafiltración contienen combinaciones de calcio y cinc a las concentraciones mencionadas anteriormente.

En otra realización, se proporciona un procedimiento para estabilizar la actividad enzimática de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) tras la expresión en cultivo celular que comprende complementar la cosecha que contiene células, el sobrenadante libre de células o un tampón de diafiltración usado para concentrar o para el intercambio de tampón de una solución de ADAMTS con calcio y cinc. En una realización específica, el procedimiento comprende el uso de un tampón que contiene calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM y cinc al menos o aproximadamente 0,5 μM. En otra realización, el tampón contiene calcio al menos o aproximadamente 2 mM y cinc al menos o aproximadamente 5 μM. En determinadas realizaciones, la concentración de calcio puede ser calcio al menos aproximadamente 0,1 mM, 0,3 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 3 mM, 5 mM o más. En determinadas realizaciones, la concentración de cinc puede ser cinc al menos aproximadamente 0,5 μM, 1 μM, 2 μM, 3 μM, 5 μM, 10 μM o más. En una realización determinada la cosecha, el sobrenadante libre de células o el tampón de diafiltración contiene combinaciones de calcio y cinc en las concentraciones mencionadas anteriormente.

En otras realizaciones, los procedimientos proporcionados en el presente documento dan como resultado una pérdida de menos del 15 % de la actividad específica presente durante cualquier etapa individual. En una realización preferente, los procedimientos proporcionados en el presente documento dan como resultado una pérdida de menos del 10 % de la actividad específica presente durante cualquier etapa individual. En una realización particular, se pierde menos del 15 % de la actividad específica presente en el sobrenadante de cultivo recuperado durante una etapa de intercambio de tampón inicial (por ejemplo, diafiltración o diálisis). En una realización preferente, se pierde menos del 10 % de la actividad específica presente en el sobrenadante de cultivo recuperado durante una etapa de intercambio de tampón inicial (por ejemplo, diafiltración o diálisis).

B. Cromatografía

En determinadas realizaciones, la composición de proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) se enriquece adicionalmente mediante una o más etapas cromatográficas. En una realización, se proporciona un procedimiento para proporcionar una composición de proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) enriquecida, comprendiendo el

procedimiento las etapas de (a) cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un medio de cultivo; (b) recuperar una parte del sobrenadante del medio de cultivo que contiene una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13); (c) intercambiar el sobrenadante del medio de cultivo por una solución tamponada que contiene cinc y calcio, para formar una primera composición de proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13); y (d) enriquecer adicionalmente la proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) con una etapa cromatográfica, proporcionando de ese modo una composición de ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) enriquecida. En una realización, el medio de cultivo contiene cinc, calcio y opcionalmente nicotinamida (vitamina B3). En una realización preferente, la etapa de cultivar una célula comprende un cultivo continuo (por ejemplo, cultivo quimiostático o en perfusión). En otra realización preferente, el cultivo se mantiene a una temperatura de entre 34 °C y 37 °C. Aún en otra realización preferente, el cultivo se mantiene a un pH de entre 6,9 y 7,2.

En una realización específica, la etapa de intercambiar el sobrenadante del medio de cultivo por una solución tamponada y/o la etapa cromatográfica comprende el uso de un tampón que contiene calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM y cinc al menos o aproximadamente 0,5 µM. En una realización preferente, ambas etapas comprenden el uso de tampones que contienen calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM y cinc al menos o aproximadamente 0,5 µM. En otra realización, el tampón contiene calcio al menos o aproximadamente 2 mM y cinc al menos o aproximadamente 5 µM. En determinadas realizaciones, la concentración de calcio puede ser calcio al menos aproximadamente 0,1 mM, 0,3 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 3 mM, 5 mM o más. En determinadas realizaciones, la concentración de cinc puede ser cinc al menos aproximadamente 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 3 µM, 5 µM, 10 µM o más. Generalmente, cualquier combinación de las concentraciones anteriores es adecuada para su uso en los presentes procedimientos.

En una realización, se proporciona un procedimiento para mantener la actividad específica de una composición de proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) durante una etapa cromatográfica complementando el/los tampón/tampones usado(s) en la etapa cromatográfica con cinc y calcio. En una realización específica, el procedimiento comprende el uso de un tampón que contiene calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM y cinc al menos o aproximadamente 0,5 µM. En otra realización, el tampón contiene calcio al menos o aproximadamente 2 mM y cinc al menos o aproximadamente 5 µM. En determinadas realizaciones, la concentración de calcio puede ser calcio al menos aproximadamente 0,1 mM, 0,3 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 3 mM, 5 mM o más. En determinadas realizaciones, la concentración de cinc puede ser cinc al menos aproximadamente 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 3 µM, 5 µM, 10 µM o más. Generalmente, cualquier combinación de las concentraciones anteriores es adecuada para su uso en los presentes procedimientos.

Los ejemplos no limitativos de técnicas cromatográficas que pueden usarse para purificar una composición de proteína ADAMTS (por ejemplo, una composición de ADAMTS13) incluyen cromatografía de intercambio aniónico (AEC), cromatografía de intercambio catiónico (CEC), cromatografía de intercambio hidrófobo (HIC), cromatografía de hidroxapatita (HAP), cromatografía de inmunoafinidad, cromatografía de exclusión molecular (es decir, filtración en gel), u otra etapa cromatográfica adecuada. Las etapas cromatográficas pueden realizarse en modo o bien discontinuo o bien en columna. En determinadas realizaciones, los tampones usados para realizar cualquiera de estas técnicas cromatográficas incluirán cinc y calcio. En una realización específica, el procedimiento comprende el uso de un tampón que contiene calcio al menos o aproximadamente 0,5 mM y cinc al menos o aproximadamente 0,5 µM. En otra realización, el tampón contiene calcio al menos o aproximadamente 2 mM y cinc al menos o aproximadamente 5 µM. En determinadas realizaciones, la concentración de calcio puede ser calcio al menos aproximadamente 0,1 mM, 0,3 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 3 mM, 5 mM o más. En determinadas realizaciones, la concentración de cinc puede ser cinc al menos aproximadamente 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 5 mM, 10 mM o más. Generalmente, cualquier combinación de las concentraciones anteriores es adecuada para su uso en los presentes procedimientos.

Puede usarse cualquier resina de intercambio aniónico adecuada en los procedimientos proporcionados en el presente documento. Los ejemplos no limitativos de resinas de intercambio aniónico adecuadas para su uso incluyen resinas de dietilaminoetilo (DEAE), aminoetilo cuaternario (QAE) y amonio cuaternario (Q).

Puede usarse cualquier resina de intercambio catiónico adecuada en los procedimientos proporcionados en el presente documento. Los ejemplos no limitativos de resinas de intercambio catiónico adecuadas para su uso incluyen resinas de carboximetilo (CM), sulfopropilo (SP), sulfonato de metilo (S).

Puede usarse cualquier resina a base de hidroxapatita u otra a base de calcio adecuada en los procedimientos proporcionados en el presente documento. Los ejemplos no limitativos de resinas adecuadas incluyen resinas de hidroxapatita, resinas de fluorapatita, resinas de fluorhidroxapatita, y similares.

Puede usarse cualquier resina de cromatografía de interacción hidrófoba adecuada en los procedimientos proporcionados en el presente documento. Los ejemplos no limitativos de resinas adecuadas incluyen fenil-resinas, metil-resinas, butil-resinas, octil-resinas, y similares.

En determinadas realizaciones, una proteína ADAMTS13 (por ejemplo, ADAMTS13) puede enriquecerse

adicionalmente mediante cromatografía de inmunoafinidad, por ejemplo con resinas conjugadas con un anticuerpo, aptámero u otra molécula de unión altamente específica para la proteína ADAMTS13 (por ejemplo, ADAMTS13).

5 En una realización, el procedimiento de reducción de la pérdida de actividad de ADAMTS da como resultado una pérdida neta de menos del 20 % durante cualquier etapa individual, incluyendo pero sin limitarse a, intercambio de
 10 tampón, diafiltración, diálisis, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, nanofiltración, ultrafiltración, filtración estéril, y similares. En otras realizaciones, los procedimientos proporcionados en el presente documento dan como resultado una pérdida de menos del 15 % de la actividad específica presente durante cualquier etapa individual. En una realización preferente, los procedimientos proporcionados en el presente
 15 documento dan como resultado una pérdida de menos del 10 % de la actividad específica presente durante cualquier etapa individual. En una realización particular, se pierde menos del 15 % de la actividad específica presente en el sobrenadante de cultivo recuperado durante una etapa de intercambio de tampón inicial (por ejemplo, diafiltración o diálisis). En una realización preferente, se pierde menos del 10 % de la actividad específica presente en el sobrenadante de cultivo recuperado durante una etapa de intercambio de tampón inicial (por ejemplo, diafiltración o diálisis).

C. Inactivación y/o eliminación de virus

20 En determinadas realizaciones, los procedimientos proporcionados en el presente documento para la preparación de una composición de ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) incluirá además al menos una etapa de inactivación o eliminación viral. En determinadas realizaciones, los procedimientos proporcionados en el presente documento incluirán al menos dos o al menos tres, etapas de inactivación o eliminación viral. Los ejemplos no limitativos de etapas de inactivación o eliminación viral que pueden emplearse con los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen, tratamiento con disolvente-detergente (Horowitz y col., Blood Coagul Fibrinolysis 1994
 25 (5 Suppl 3):S21-S28 y Kreil y col., Transfusion 2003 (43):1023-1028), nanofiltración (Hamamoto y col., Vox Sang 1989 (56):230-236 y Yuasa y col., J Gen Virol. 1991 (72 (pt 8)):2021-2024). En una realización preferente, la presente invención proporciona procedimientos para la preparación de una composición de ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) que comprende tratamiento con disolvente-detergente y nanofiltración.

30 En una realización, se proporciona un procedimiento para proporcionar una composición de proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) segura desde el punto de vista de los virus, comprendiendo el procedimiento las etapas de (a) cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un medio de cultivo; (b) recuperar una parte del sobrenadante del medio de cultivo que contiene una proteína
 35 ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13); (c) intercambiar el sobrenadante del medio de cultivo por una solución tamponada que contiene cinc y calcio, para formar una primera composición de proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13); (d) opcionalmente enriquecer adicionalmente la proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) con una etapa cromatográfica; y (e) realizar al menos una etapa de inactivación o eliminación de virus, proporcionando de ese modo una composición de ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) segura desde el punto de vista de los virus. En una realización, el medio de cultivo contiene cinc, calcio y opcionalmente nicotinamida (vitamina B3). En una
 40 realización preferente, la etapa de cultivar una célula comprende un cultivo continuo (por ejemplo, cultivo quimiostático o en perfusión). En otra realización preferente, el cultivo se mantiene a una temperatura de entre 34 °C y 37 °C. Aún en otra realización preferente, el cultivo se mantiene a un pH de entre 6,9 y 7,2. En una realización, la etapa de eliminación de virus es nanofiltración.

45 1. Tratamiento con disolvente y detergente (S/D)

Con el fin de inactivar diversos contaminantes virales que pueden estar presentes en cultivo de ADAMTS, pueden someterse una o más disoluciones intermedias de ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) a un tratamiento con disolvente-detergente (S/D). Se conocen bien en la técnica procedimientos para el tratamiento con detergente de disoluciones (para revisión véase Pelletier JP y col., Best Pract Res Clin Haematol. 2006; 19(1):205-42).
 50 Generalmente, puede usarse cualquier tratamiento con S/D convencional conjuntamente con los procedimientos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, se proporciona a continuación un protocolo para un tratamiento con S/D.

55 En una realización, se añaden Triton X-100, Tween-20 y tri(n-butil)fosfato (TNBP) a una solución intermedia de ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) a concentraciones finales de a o aproximadamente el 1,0 %, el 0,3 % y el 0,3 %, respectivamente. Entonces se agita la mezcla a una temperatura a o aproximadamente a entre 18 °C y 25 °C durante al menos aproximadamente una hora.

60 2. Nanofiltración y ultra/diafiltración

Con el fin de reducir la carga viral de una composición de proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) proporcionada en el presente documento, la composición puede nanofiltrarse usando un dispositivo de nanofiltración adecuado. En determinadas realizaciones, el dispositivo de nanofiltración tendrá un tamaño de poro medio de a o aproximadamente a entre 15 nm y 200 nm. Los ejemplos de nanofiltros adecuados para este uso incluyen, sin limitación, DVD, DV 50, DV 20 (Pall), Viresolve NFP[®], Viresolve NFR[®] (Millipore), Planova[®] 15N, 20N, 35N y 75N
 65

(Planova). En una realización específica, el nanofiltro puede tener un tamaño de poro medio de a o aproximadamente a entre 15 y 72 nm, o a o aproximadamente a entre 19 y 35 nm, o de a o aproximadamente a 15 nm, 19 nm, 20 nm, 35 nm o 72 nm. En una realización preferente, el nanofiltro tendrá un tamaño de poro medio de a o aproximadamente a 19 nm, 20 nm o 35 nm, tal como un filtro Asahi PLANOVA® 20N o PLANOVA® 35N o equivalente del mismo.

Posteriormente a la nanofiltración, el filtrado puede concentrarse opcionalmente mediante ultrafiltración y/o la composición de tampón ajustarse mediante diafiltración. En determinadas realizaciones, la ultrafiltración se lleva a cabo en un casete con un tamiz de canal abierto y la membrana de ultrafiltración tiene un punto de corte de peso molecular nominal (NMWCO) de menos de a o aproximadamente a 175 kDa o menos de a o aproximadamente a 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, o menos kDa. En una realización preferente, la membrana de ultrafiltración tiene un NMWCO de no más de 30 kDa. En otra realización preferente, la membrana de ultrafiltración tiene un NMWCO de no más de 30 kDa.

3. Liofilización y tratamiento térmico

Aún en otras realizaciones, la actividad viral de una composición de proteína ADAMTS13 (por ejemplo, ADAMTS13) liofilizada, que puede haberse sometido previamente a otras etapas de inactivación o eliminación viral tales como nanofiltración, puede reducirse adicionalmente mediante tratamiento térmico de la composición liofilizada. Se conocen bien en la técnica tratamientos térmicos para la inactivación de cargas virales en factores sanguíneos (por ejemplo, véase, Piszkwicz y col., *Thromb Res.* 15 de julio de 1987; 47(2):235-41; Piszkwicz y col., *Curr Stud Hematol Blood Transfus.* 1989;(56):44-54; Epstein y Fricke, *Arch Pathol Lab Med.* Marzo de 1990; 114(3):335-40).

VI. Composiciones de ADAMTS

Ventajosamente, se ha encontrado que proteínas ADAMTS, tales como ADAMTS13, expresadas en cultivos celulares complementados con cinc, calcio y/o nicotinamida (vitamina B3) tienen actividades específicas inesperadamente altas. Tal como se proporciona en el presente documento, se han desarrollado procedimientos para la expresión continua y recuperación de tales proteínas ADAMTS con actividades específicas altas. Por ejemplo, procedimientos de cultivo celular continuo proporcionados en el presente documento permiten la expresión de más de 1 mg de ADAMTS13 por litro al día con actividades específicas de más de 1000 U/mg durante más de una semana o más. De manera similar, también se proporcionan en el presente documento procedimientos para reducir la pérdida de actividad normalmente encontrada durante la purificación de la proteína ADAMTS13.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona composiciones de proteína ADAMTS (por ejemplo, composiciones de ADAMTS13) expresadas en cultivo celular según los procedimientos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, se proporcionan composiciones de proteína ADAMTS, en el que la proteína se expresa cultivando una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS en medio de cultivo complementado con al menos un componente seleccionado de calcio, cinc y nicotinamida (vitamina B3). También se proporcionan composiciones de proteína ADAMTS (por ejemplo, composiciones de ADAMTS13) que se purifican según a procedimiento proporcionado en el presente documento. Por ejemplo, se proporcionan composiciones de proteína ADAMTS que se han purificado según un procedimiento que comprende una etapa de intercambio de tampón, en el que el tampón de intercambio incluye cinc y calcio. En realizaciones preferentes de la invención, la composición de proteína ADAMTS es una composición de ADAMTS13.

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones de proteína ADAMTS (por ejemplo, composiciones de ADAMTS13) que se preparan mediante un procedimiento que comprende la expresión de la proteína ADAMTS en un cultivo celular según cualquier procedimiento proporcionado en el presente documento. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona composiciones de proteína ADAMTS (por ejemplo, composiciones de ADAMTS13) que se preparan mediante un procedimiento que comprende la inclusión de tanto cinc como calcio en al menos un tampón durante la purificación de la proteína ADAMTS de un medio de cultivo. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

La presente invención proporciona composiciones de proteína ADAMTS (por ejemplo, composiciones de ADAMTS13) preparadas mediante un procedimiento proporcionado en el presente documento. En una realización, la composición de ADAMTS (por ejemplo, composición de ADAMTS13) se prepara cultivando una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS en medio de cultivo complementado con al menos un componente seleccionado de calcio, cinc y nicotinamida (vitamina B3). En una realización específica, se prepara una composición de ADAMTS cultivando una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS en medio de cultivo complementado con al menos dos componentes seleccionados de calcio, cinc y nicotinamida (vitamina B3). Aún en otra realización, el medio de cultivo está complementado con calcio, cinc y nicotinamida (vitamina B3). En algunas realizaciones, el medio de cultivo puede ser un medio de cultivo libre de proteínas animales, libre de oligopéptidos o definido químicamente. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En una realización, se prepara una composición de proteína ADAMTS (por ejemplo, composición de ADAMTS13) cultivando una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS en un medio de cultivo que comprende cinc al menos a o aproximadamente a 2 μM . En otra realización, la composición se prepara cultivando una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS en un medio de cultivo que comprende cinc al menos a o aproximadamente a 5 μM . En una realización, la composición se prepara cultivando una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS en un medio de cultivo que comprende cinc a o aproximadamente a entre 2 μM y 12 μM . En otra realización, la composición se prepara cultivando una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS en un medio de cultivo que comprende cinc a o aproximadamente a entre 5 μM y 12 μM . Aún en otras realizaciones, la composición se prepara cultivando una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS en un medio de cultivo que comprende cinc al menos a o aproximadamente a 2 μM , o al menos a o aproximadamente a 3 μM , 4 μM , 5 μM , 6 μM , 7 μM , 8 μM , 9 μM , 10 μM , 11 μM , 12 μM , en determinados aspectos comparativos 13 μM , 14 μM , 15 μM , 20 μM , 25 μM , 30 μM o más. En una realización, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En una realización específica, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a 36 °C. En otra realización, el pH del cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 6,9 y 7,3. En una realización, la temperatura y/o el pH del cultivo se mantienen durante al menos 7 días. En una realización, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo continuo. En realizaciones específicas, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo de quimiostato, turbidostato o perfusión funcionando en modo de suspensión. En otras realizaciones específicas, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo de quimiostato, turbidostato o perfusión funcionando en modo adherente. En otra realización, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo discontinuo. En realizaciones específicas, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo de un único lote, lotes repetidos o semicontinuo en modo en suspensión. En otras realizaciones específicas, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo de un único lote, lotes repetidos o semicontinuo en modo adherente. En una realización, la célula que alberga el ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS es una célula de mamífero. En realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En una realización de una composición de proteína ADAMTS (por ejemplo, composición de ADAMTS13), el medio de cultivo usado para la expresión de la proteína ADAMTS puede complementarse con cinc a una concentración final de al menos aproximadamente 2 μM a al menos aproximadamente 12 μM . En determinadas realizaciones, el medio de cultivo puede complementarse con cinc a una concentración final de al menos aproximadamente 2 μM , o al menos 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 , 30 μM o niveles superiores de cinc. Generalmente, puede usarse cualquier sal de cinc para complementar los medios de la invención, los ejemplos no limitativos de sales aceptables incluyen $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2\text{Zn}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 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 de la invención. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En otra realización, se prepara una composición de proteína ADAMTS (por ejemplo, composición de ADAMTS13) cultivando una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS en un medio de cultivo que comprende calcio al menos a o aproximadamente a 0,5 mM. En otra realización, se prepara una composición de ADAMTS cultivando una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS en un medio de cultivo que comprende calcio al menos a o aproximadamente a 1,5 mM. En una realización, se prepara una composición de ADAMTS cultivando una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS en un medio de cultivo que comprende calcio a o aproximadamente a entre 0,5 mM y 1,5 mM. Aún en otras realizaciones, se prepara una composición de ADAMTS cultivando una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS en un medio de cultivo que comprende calcio al menos a o aproximadamente a 0,5 mM, o al menos a o aproximadamente a 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 cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En una realización específica, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a 36 °C. En otra realización, el pH del cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 6,9 y 7,3. En una realización, la temperatura y/o el pH del cultivo se mantienen durante al menos 7 días. En una realización, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo continuo. En realizaciones específicas, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo de quimiostato, turbidostato o perfusión funcionando en modo en suspensión. En otras realizaciones específicas, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo de quimiostato, turbidostato o perfusión funcionando en modo adherente. En otra realización, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo discontinuo. En realizaciones específicas, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo de un único lote, lotes repetidos o semicontinuo

funcionando en modo en suspensión. En otras realizaciones específicas, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo de un único lote, lotes repetidos o semicontinuo funcionando en modo adherente. En una realización, la célula que alberga el ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS es una célula de mamífero. En realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

Generalmente, puede usarse cualquier sal de calcio para complementar los medios de la invención. Los ejemplos no limitativos de sales aceptables incluyen 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 de la invención.

En otra realización, se prepara una composición de proteína ADAMTS (por ejemplo, composición de ADAMTS13) cultivando una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS en un medio de cultivo que comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos a o aproximadamente a 2 mg/l. En otra realización, se prepara una composición de ADAMTS cultivando una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS en un medio de cultivo que comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos a o aproximadamente a 7 mg/l. En una realización, se prepara una composición de ADAMTS cultivando una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS en un medio de cultivo que comprende nicotinamida (vitamina B3) a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 10 mg/l. Aún en otras realizaciones, se prepara una composición de ADAMTS cultivando una célula de mamífero que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS en un medio de cultivo que comprende nicotinamida (vitamina B3) al menos a o aproximadamente a 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 superiores. En una realización, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 35 °C y 37 °C. En una realización específica, el cultivo se mantiene a o aproximadamente a 36 °C. En otra realización, el pH del cultivo se mantiene a o aproximadamente a entre 6,9 y 7,3. En una realización, la temperatura y/o el pH del cultivo se mantienen durante al menos 7 días. En una realización, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo continuo. En realizaciones específicas, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo de quimiostato, turbidostato o perfusión funcionando en modo en suspensión. En otras realizaciones específicas, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo de quimiostato, turbidostato o perfusión funcionando en modo adherente. En otra realización, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo discontinuo. En realizaciones específicas, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo de un único lote, lotes repetidos o semicontinuo funcionando en modo en suspensión. En otras realizaciones específicas, el procedimiento se realiza en condiciones de cultivo de un único lote, lotes repetidos o semicontinuo funcionando en modo adherente. En una realización, la célula que alberga el ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS es una célula de mamífero. En realizaciones particulares, la célula de mamífero es una célula de hámster, humana o murina. En una realización específica, la célula es una línea celular CHO, una línea celular HEK 293 o una línea celular BHK. En otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo libre de proteínas y/o polipéptidos animales. Aún en otra realización, la célula de mamífero se cultiva en un medio de cultivo sintético, que puede estar o no libre de proteínas y polipéptidos animales. En una realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 0,5 mg/l y 30 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo comprende además una poliamina a o aproximadamente a entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En una realización, se prepara una composición de ADAMTS cultivando una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un medio de cultivo complementado tanto con cinc como con calcio. En determinadas realizaciones, las concentraciones de cinc y calcio pueden ser cualquiera de las descritas en el presente documento. En determinadas realizaciones, las concentraciones de cinc y calcio serán una de Var. 94 a Var. 113 (tabla 7). En determinadas realizaciones, el cultivo se mantiene durante al menos 7 días, o al menos 14 días, 21 días, 28 días, o al menos 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, o al menos 2 meses, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses o más. En una realización, el cultivo en un cultivo en perfusión. En otra realización, el cultivo es un cultivo quimiostático. En otras realizaciones, el cultivo es un cultivo semicontinuo o cultivo de lotes repetidos. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

En una realización, se prepara una composición de ADAMTS cultivando una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un medio de cultivo complementado tanto con cinc como con nicotinamida (vitamina B3). En determinadas realizaciones, las concentraciones de cinc y nicotinamida (vitamina B3) pueden ser cualquiera de las descritas en el presente documento. En determinadas realizaciones, las concentraciones de cinc y nicotinamida (vitamina B3) serán una de Var. 114 a Var. 133 (tabla 8). En determinadas realizaciones, el cultivo se mantiene durante al menos 7 días, o al menos 14 días, 21 días, 28 días, o al menos 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, o al menos 2 meses, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses

o más. En una realización, el cultivo es un cultivo en perfusión. En otra realización, el cultivo es un cultivo quimiostático. En otras realizaciones, el cultivo es un cultivo semicontinuo o de lotes repetidos. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

5 En una realización, se prepara una composición de ADAMTS cultivando una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un medio de cultivo complementado tanto con calcio como con nicotinamida (vitamina B3). En determinadas realizaciones, las concentraciones de calcio y nicotinamida (vitamina B3) pueden ser cualquiera de las descritas en el presente documento. En determinadas realizaciones, las concentraciones de calcio y nicotinamida (vitamina B3) serán una de Var. 134 a Var. 149 (tabla 9).
10 En determinadas realizaciones, el cultivo se mantiene durante al menos 7 días, o al menos 14 días, 21 días, 28 días, o al menos 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, o al menos 2 meses, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses o más. En una realización, el cultivo es un cultivo en perfusión. En otra realización, el cultivo es un cultivo quimiostático. En otras realizaciones, el cultivo es un cultivo semicontinuo o de lotes repetidos. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

15 En una realización, se prepara una composición de ADAMTS cultivando una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en un medio de cultivo complementado con cinc, calcio y nicotinamida (vitamina B3). En determinadas realizaciones, las concentraciones de cinc, calcio y nicotinamida (vitamina B3) pueden ser cualquiera de las descritas en el presente documento. En determinadas realizaciones, las concentraciones de cinc, calcio y nicotinamida (vitamina B3) serán una de las variaciones Var. 14 a Var. 93 (tabla 3 a tabla 6). En determinadas realizaciones, el cultivo se mantiene durante al menos 7 días, o al menos 14 días, 21 días, 28 días, o al menos 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, o al menos 2 meses, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses o más. En una realización, el cultivo es un cultivo en perfusión. En otra realización, el cultivo es un cultivo quimiostático. En otras realizaciones, el cultivo es un cultivo semicontinuo o de lotes repetidos. En una realización preferente, la proteína ADAMTS es ADAMTS13.

25 En otra realización, se proporcionan composiciones de ADAMTS13 con actividades específicas altas, por ejemplo, una actividad específica de al menos 600 U/mg de proteína A13. En otra realización, la composición de ADAMTS13 tiene una actividad específica de al menos 700 U/mg. En otra realización, la composición de ADAMTS13 tiene una actividad específica de al menos 800 U/mg. En otra realización, la composición de ADAMTS13 tiene una actividad específica de al menos 900 U/mg. En otra realización, la composición de ADAMTS13 tiene una actividad específica de al menos 1000 U/mg. En otra realización, la composición de ADAMTS13 tiene una actividad específica de al menos 1100 U/mg. En otra realización, la composición de ADAMTS13 tiene una actividad específica de al menos 1200 U/mg. En otra realización, la composición de ADAMTS13 tiene una actividad específica de al menos 1300 U/mg. En otra realización, la composición de ADAMTS13 tiene una actividad específica de al menos 1400 U/mg. En otra realización, la composición de ADAMTS13 tiene una actividad específica de al menos 1500 U/mg. En otra realización, la composición de ADAMTS13 tiene una actividad específica de al menos 1600 U/mg. En otra realización, la composición de ADAMTS13 tiene una actividad específica de al menos 1700 U/mg. En otra realización, la composición de ADAMTS13 tiene una actividad específica de al menos 1800 U/mg. En otra realización, la composición de ADAMTS13 tiene una actividad específica de al menos 1900 U/mg. En otra realización, la composición de ADAMTS13 tiene una actividad específica de al menos 2000 U/mg. En otra realización, la composición de ADAMTS13 tiene una actividad específica de al menos 2100 U/mg. En otra realización, la composición de ADAMTS13 tiene una actividad específica de al menos 2200 U/mg. En otra realización, la composición de ADAMTS13 tiene una actividad específica de al menos 2300 U/mg. En otra realización, la composición de ADAMTS13 tiene una actividad específica de al menos 2400 U/mg. En otra realización, la composición de ADAMTS13 tiene una actividad específica de al menos 2500 U/mg.

50 VII. Ejemplos

Ejemplo 1

Se realizaron experimentos semicontinuos usando cultivos en biorreactor de la línea de células HEK293 recombinantes 1020/1 013-2 que expresan ADAMTS13 humana en medio BACD-A13 definido químicamente. Se investigó el efecto de complementar el medio de cultivo con cinc adicional.

Se cultivaron células HEK293 recombinantes que expresan ADAMTS13 humana mediante cultivos celulares semicontinuos en biorreactores de 1,5 l con impulsores de paletas a un pH controlado en línea de 7,20 a 37 °C con una concentración de oxígeno disuelto del 20 % de saturación de aire. Se transfirió la suspensión celular a 2 biorreactores idénticos que contenían un medio de cultivo definido químicamente basado en DMEM/F12 (BACD-A13; tabla 12). Se hicieron crecer los dos cultivos en medios BACD-A13 preparados con o bien ZnSO₄·7H₂O 0,432 mg/l, como en DMEM/F12, o bien con una complementación adicional de ZnSO₄·7H₂O 1 mg/l para una concentración final de 1,432 mg/l. Por lo demás, los dos cultivos semicontinuos se trataron igual y por tanto pueden compararse directamente entre sí.

Se midió la actividad de A13 en sobrenadantes de cultivo mediante el ensayo de FRETS-VWF73 tras centrifugar o

filtrar los sobrenadantes para retirar células residuales. Se midió la cantidad total de A13 mediante ELISA, usando un anticuerpo específico de A13 (tabla 10). El sobrenadante del cultivo que empleaba medio BACD-A13 con una concentración de cinc en DMEM/F12 convencional tenía una actividad de A13 de 728 y 826 mU/ml los días 3 y 6, respectivamente. Las actividades específicas de los cultivos eran 482 mU/ μ g y 526 mU/ μ g de A13, respectivamente. En contraposición, los sobrenadantes de cultivos que tenían complementación adicional de Zn, aunque tenía sólo rendimientos ligeramente mejorados de expresión de A13 (el 7 % y el 19 % mayores los días 3 y 6, respectivamente), mostraron actividades específicas y totales de A13 drásticamente mejoradas (tabla 11). Tal como puede observarse comparando los resultados en la tabla 10 y la tabla 11, la actividad de FRETTS-VWF73 de A13 total era el 118 % superior (1589 frente a 728) el día 3 y el 61 % superior (1381 frente a 728) el día 6 para cultivos hechos crecer en presencia de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,432 mg/l en comparación con cultivos hechos crecer a $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,432 mg/l. De manera similar, la actividad específica de la proteína A13 en los cultivos complementados era el 104 % superior (981 frente a 482 mU/mg) el día 3 y el 42 % superior (739 frente a 526 mU/mg) el día 6.

Se tomaron muestras de los biorreactores y se analizaron para determinar A13 mediante ELISA, se midió la actividad de A13 mediante ensayo de FRETTS-VWF73. Se determinaron los recuentos celulares mediante tecnología Nucleocounter. Se midieron las tasas de dilución y se usaron para el cálculo de las tasas de crecimiento y las productividades volumétricas.

Tabla 10. Datos de fermentación para el cultivo semicontinuo 1 realizado en un biorreactor de 1,5 l con medio BACD-A13 sin complementación con cinc.

Día de recogida del sobrenadante	Concentración celular	Tasa de crecimiento específica	FRETTS de A13	ELISA de A13	Actividad específica	Rendimiento de FRETTS	Rendimiento de A13
	[10^6 células/ml]	[1/d]	[mU/ml]	[μ g/ml]	[mU/ μ g]	[U/l/d]	[mg/l/d]
3	2,18	0,619	728	1,51	482	228	0,41
6	1,88	0,256	826	1,57	526	178	0,32

Tabla 11. Datos de fermentación para el experimento semicontinuo realizado en un biorreactor de 1,5 l con medio BACD-A13 con complementación con cinc.

Día de recogida del sobrenadante	Concentración celular	Tasa de crecimiento específica	FRETTS de A13	ELISA de A13	Actividad específica	Rendimiento de FRETTS	Rendimiento de A13
	[10^6 células/ml]	[1/d]	[mU/ml]	[μ g/ml]	[mU/ μ g]	[U/l/d]	[mg/l/d]
3	2,48	0,662	1589	1,62	981	515	0,45
6	1,38	0,11	1381	1,87	739	249	0,41

Tabla 12. Composición del medio de cultivo celular BACD-A13 definido químicamente.

Composición del medio de cultivo celular BACD-A13	Concentración convencional
Aminoácidos	mg/l
L-Alanina	13,3500
L-Arginina HCl	147,5000
L-Asparagina-H ₂ O	45,1600
Ácido L-aspártico	19,9500
L-Cisteína HCl-H ₂ O	32,5500
L-Cisteína 2HCl	102,3500
Ácido L-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)	Variable (58,3-174,9)

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	106,5100
NaH ₂ PO ₄ anhidro	54,3500
Sulfato de cinc heptahidratado (ZnSO ₄ -27H ₂ O)	Variable (0,432-3,432)
Selenito de sodio.anhidro	0,0087
Vitaminas	mg/l
Ácido ascórbico	3,499
Biotina	0,0035
Cloruro de colina	8,980
D-Pantotenato de Ca	2,240
Ácido fólico	2,650
I-Inositol	12,600
Nicotinamida	Variable (2,0-7,0)
Piridoxina HCl	2,031
Riboflavina	0,219
Tiamina HCl	2,170
Vitamina B12	0,680
Misceláneo	mg/l
D-Glucosa	5000,00
Ácido linoleico	0,042
Ácido lipoico	0,105
Putrescina 2HCl	3,681
Timidina	0,365
Hipoxantina de Na	2,390
Piruvato de sodio	55,000
	mg/l
L-Glutamina	1000,0000
Pluronic F68	1000,0000
Etanolamina	1,5300
Hidrogenocarbonato de Na	1,5000

Ejemplo 2

5 Se realizaron experimentos semicontinuos usando cultivos en biorreactor de la línea celular CHO recombinante n.º 938 que expresa ADAMTS13 humana en medio BACD-A13 definido químicamente. Se investigó el efecto de la complementación del medio de cultivo con cinc y/o vitamina B3 adicional.

10 Se adaptaron células CHO recombinantes que expresan ADAMTS13 humana a un medio BCS definido químicamente (medio BCS). Se descongeló el clon n.º 938 de Development Working Cell Bank#01 (DWCB#01) y se preparó el inóculo celular en medio BCS. Se transfirieron las células a dos biorreactores de 1,5 l con impulsores de paletas y se hicieron crecer en cultivo celular semicontinuo en medio BACD-A13 registrado con un pH controlado en línea de 7,20 a 37 °C con una concentración de oxígeno disuelto del 20 % de saturación de aire. Se hicieron crecer los dos cultivos en medios BACD-A13 preparados con o bien ZnSO₄·7H₂O 0,432 mg/l, como en DMEM/F12, o bien con una complementación adicional de ZnSO₄·7H₂O 1 mg/l para una concentración final de 1,432 mg/l. Por lo demás, los dos cultivos semicontinuos se trataron igual y, por tanto, pueden compararse directamente entre sí. Se recogieron los sobrenadantes los días 4 y 7 y se analizaron para determinar la proteína A13 y los niveles de actividad. Tras la recogida el día 7, se complementaron ambos cultivos con nicotinamida (vitamina B3) 5 mg/l adicional, para una concentración final de 7,02 mg/l, y se hicieron crecer en condiciones idénticas durante 4 días adicionales. Se recogieron de nuevo los sobrenadantes el día 11 y se analizaron para determinar los niveles de proteína A13 de actividad.

25 En el primer cultivo, cultivado sin complementación con cinc, los niveles de actividad de A13 en el sobrenadante recogido fueron de 642 y 488 mU/ml los días 4 y 7, respectivamente (tabla 13). Las actividades específicas para estos sobrenadantes fueron de 371 y 273 mU/μg los días 4 y 7, respectivamente. Tal como se observó anteriormente en el ejemplo 1, las actividades específicas y total de la A13 en el sobrenadante de cultivo complementado con cinc adicional estaban significativamente aumentadas (compárense la tabla 13 y la tabla 14 los días de recogida 4 y 7). Como anteriormente, la A13 total producida en ambos cultivos era similar, sin embargo, la actividad total de la A13 del sobrenadante del segundo cultivo, complementado con cinc adicional, fue un 40 % y un

104 % mayor los días 4 y 7, respectivamente, y la actividad específica fue un 78 % y un 75 % mayor los días 4 y 7 (tabla 14 frente a tabla 13). Otros parámetros, incluyendo el rendimiento de A13 total y la tasa de crecimiento celular parecían no estar afectados por la complementación adicional con cinc.

5 Tras la recogida de los sobrenadantes el día 7, se complementaron adicionalmente ambos cultivos con nicotinamida (vitamina B3) 5 mg/l adicional y se cultivaron en condiciones idénticas durante 4 días adicionales. Se recogieron los sobrenadantes como anteriormente el día 11. La complementación con vitamina B3 dio como resultado un aumento en la actividad de FRETs-VWF73 total y la actividad específica de A13 encontrada en los sobrenadantes de ambos cultivos (tabla 13 y tabla 14, día 11). De manera notable, estos valores se duplicaron aproximadamente en ambos cultivos. El día 11, el sobrenadante del cultivo 2, complementado con adición de cinc y vitamina B3, demostró una actividad total casi del 200 % mayor (2.366 frente a 791 mU/ml) y una actividad específica el 174 % mayor (1.189 frente a 432 mU/mg) que el sobrenadante recogido del cultivo 1.

15 La complementación del medio con nicotinamida sola dio como resultado un aumento de aproximadamente el 60 % de la actividad total (791 mU/ml frente a 488 mU/ml; compárese la tabla 13 los días 7 y 11) y la actividad específica (432 mU/mg frente a 273 mU/mg; compárese en la tabla 13 los días 7 y 11) de A13. De manera similar, la complementación del medio con cinc solo dio como resultado aumentos de entre aproximadamente el 70 % y el 80 % en la actividad total y actividad específica de A13 (compárese la tabla 13 y la tabla 14 los días 4 y 7). Sorprendentemente, la complementación del medio de cultivo con tanto nicotinamida como cinc dio como resultado un aumento sinérgico de entre aproximadamente el 300 % y el 400 % en la actividad total (compárese la tabla 14 el día 11 con la tabla 13 los días 4 y 7) y de entre aproximadamente el 200 % y el 300 % en la actividad específica (compárese la tabla 14 el día 11 con la tabla 13 los días 4 y 7) de A13, demostrando una interacción sinérgica inesperada entre los efectos del cinc y la nicotinamida.

25 Tabla 13. Datos de fermentación para el experimento discontinuo CP_07/18_M04: hA13 CHO Klon #985/1 938 DWCB#01.

Día de recogida del sobrenadante	Concentración celular	Tasa de crecimiento específica	FRETs de A13	ELISA de A13	Actividad específica	Rendimiento de FRETs	Rendimiento de A13
	[10 ⁶ células/ml]	[1/d]	[mU/ml]	[µg/ml]	[mU/µg]	[U/l/d]	[mg/l/d]
4*	2,33	0,539	642	1,73	371	161	0,43
7*	1,58	0,407	488	1,79	273	120	0,48
11†	1,65	0,413	791	1,83	432	173	0,37

* BAV-CD-A13; ZnSO₄·7H₂O 0,432 mg/l; nicotinamida 2 mg/

† BAV-CD-A13; ZnSO₄·7H₂O 0,432 mg/l; nicotinamida 7 mg/l

30 Tabla 14. Datos de fermentación para el experimento discontinuo CP_07/18_M07: hA13 CHO Klon #985/1 985 DWCB#01.

Día de recogida del sobrenadante	Concentración celular	Tasa de crecimiento específica	FRETs de A13	ELISA de A13	Actividad específica	Rendimiento de FRETs	Rendimiento de A13
	[10 ⁶ células/ml]	[1/d]	[mU/ml]	[µg/ml]	[mU/µg]	[U/l/d]	[mg/l/d]
4*	1,73	0,527	898	1,36	660	224	0,34
7*	2,10	0,505	996	2,08	479	252	0,57
11†	1,88	0,420	2366	1,99	1189	550*	0,41

* BAV-CD-A13; ZnSO₄·7H₂O 1,432 mg/l; nicotinamida 2 mg/

† BAV-CD-A13; ZnSO₄·7H₂O 1,432 mg/l; nicotinamida 7 mg/l

Ejemplo 3

40 Se hizo crecer un cultivo celular en quimiostato de la línea celular CHO recombinante n.º 640-2 que expresaba ADAMTS13 humana, en medio BACD-A13 definido químicamente complementado con cinc adicional y vitamina B3. Se mantuvo el cultivo de 10 l durante 53 días y se monitorizó la producción de proteína A13 y la actividad a lo largo del tiempo.

45 Se adaptaron células CHO recombinantes que expresaban ADAMTS13 humana a un medio registrado definido químicamente (medio BCS). Se descongeló un vial del banco de células y se preparó el inóculo celular en medio BCS. Se transfirieron células propagadas a partir del clon de expresión de A13 n.º 640-2 a un biorreactor de 10 l con impulsores de tipo Rushton y se cultivaron en cultivos discontinuos repetidos con medio BACD-A13 registrado a un pH controlado en línea de 7,15-7,20 a 37 °C con una concentración de oxígeno disuelto del 20 % de saturación de aire. Tras cultivar los 2 cultivos discontinuos hasta el volumen de trabajo final de 10 l, se cambió el biorreactor a alimentación continua con medio el día 5 y se hizo funcionar durante 48 días adicionales en un modo en quimiostato.

Se tomaron semanalmente muestras del sobrenadante de los biorreactores y se analizaron para determinar la producción de proteína A13 mediante ELISA y la actividad de A13 mediante ensayo de FRET-S-VWF73. Se determinaron los recuentos celulares mediante tecnología Nucleocounter. Se midieron las tasas de dilución y se usaron para el cálculo de las tasas de crecimiento y las productividades volumétricas.

En condiciones de cultivo continuo usando medio BACD-A13 definido químicamente complementado con cinc y nicotinamida a una concentración final de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,432 mg/l y nicotinamida 7,02 mg/l, se lograron niveles altos de producción de proteína A13, entre 0,9 y 1,3 mg/l/d, y actividades específicas, entre aproximadamente 800 y 1100 mU/ μ g de A13 (tabla 15). Estos resultados concordaban con la producción de proteína y las actividades específicas logradas con el clon de CHO n.º 938, como en el ejemplo 2. De manera notable, las productividades específicas de células y volumétricas aumentaron a lo largo del tiempo en el cultivo a largo plazo, probablemente debido a las tasas de dilución y crecimiento crecientes a lo largo del tiempo. La actividad específica alta de la A13 expresada pudo mantenerse al menos a un nivel alto de manera constante a lo largo de al menos las 7 semanas en las que el cultivo se hizo crecer en condiciones quimiostáticas. De hecho, la actividad específica de la A13 producida en el cultivo aumentó realmente desde aproximadamente 800 mU/ μ g de A13 en la semana 2 hasta aproximadamente 1100 mU/ μ g de A13 en la semana 7.

Tabla 15. Datos de fermentación para el experimento de cultivo continuo CP_07/30_F02: hA13 CHO Klon #987/1 640-2.

Semana de cultivo en quimostato n.º	Concentración celular	Tasa de crecimiento específica	Tasa de dilución	FRET-S de A13	ELISA de A13	Actividad específica	Rendimiento de FRET-S	Rendimiento de A13
	[10 ⁶ células/ml]	[1/d]	[1/d]	[mU/ml]	[μ g/ml]	[mU/ μ g]	[U/l/d]	[mg/l/d]
2	1,43	0,36	0,36	1954	2,48	788	713	0,91
3	1,56	0,41	0,40	2254	2,32	972	913	0,94
4	1,46	0,38	0,40	2244	2,41	931	889	0,95
5	1,58	0,43	0,43	2514	2,88	873	1086	1,24
6	1,70	0,51	0,46	2737	2,71	1010	1270	1,26
7	1,76	0,53	0,52	2322	2,18	1065	1200	1,13

Ejemplo 4

Se realizaron experimentos de cultivo celular en quimostato y semicontinuo usando cultivos en biorreactor de la línea celular CHO recombinante n.º 640-2 que expresa ADAMTS 13 humana en medio BACD-A13 definido químicamente. Se investigó el efecto de la complementación del medio de cultivo con diferentes niveles de cinc.

Se adaptaron células CHO recombinantes que expresan ADAMTS13 humana a un medio registrado definido químicamente, medio BCS, en modo semicontinuo. En resumen, se descongeló DWCB#05 y se preparó el inóculo celular en medio BCS. Se transfirieron las células a un biorreactor de 1,5 l con impulsores de paletas y en medio BACD-A13 registrado complementado con nicotinamida a una concentración final de 7 mg/l, pero sin complementación con cinc a un pH controlado en línea de 7,20 a 37 °C con una concentración de oxígeno disuelto del 20 % de saturación de aire. Entonces se dividió la suspensión de células del lote en tres biorreactores idénticos que contenían medio BACD-A13 complementado con nicotinamida a una concentración final de 7 mg/l con diferentes complementaciones con Zn ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0 mg/l; 0,5 mg/l; y 1,0 mg/l hasta una concentración final de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,432 mg/l; 0,932 mg/l; y 1,432 mg/l).

Los medios BACD-A13 incluían $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,432 mg/l con o sin complementación de cinc adicional. Por lo demás, los cultivos y el medio eran iguales y por tanto pueden compararse directamente entre sí. Se hicieron crecer los cultivos en modo semicontinuo durante aproximadamente una semana y se sometió a ensayo el sobrenadante para determinar la producción de proteína A13 y la actividad de FRET-S-VWF73. A continuación, se cambiaron los tres biorreactores al modo de cultivo en quimostato y se hicieron funcionar durante aproximadamente 2 semanas en condiciones de cultivo continuo usando los medios con diferentes complementaciones con cinc, tal como se ha descrito anteriormente.

En las condiciones de cultivo semicontinuo, consecuente con los resultados observados en los ejemplos 1 y 2, la complementación del medio con $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ o bien 0,5 mg/l o bien 1,0 mg/l aumentó significativamente la actividad específica de la proteína A13 en el sobrenadante (785 mU/ μ g y 876 mU/ μ g, respectivamente) en comparación con medio no complementado con cinc adicional (437 mU/ μ g) (tabla 16). Como anteriormente, otros parámetros, incluyendo la producción de proteína A13 total y el crecimiento celular específico, no se vieron afectados por la complementación con cinc adicional.

Tabla 16. Datos de fermentación para experimentos semicontinuos de la expresión de A13 humana en medio con y sin complementación con cinc adicional.

Cinc adicional	Concentración celular	Tasa de crecimiento específica	FRETS de A13	ELISA de A13	Actividad específica	Rendimiento de FRETS	Rendimiento de A13
	[10 ⁶ células/ml]	[1/d]	[mU/ml]	[μg/ml]	[mU/μg]	[U/l/d]	[mg/l/d]
0	1,44	0,420	853,0	1,952	437	230,3	0,506
0,5 mg/l	1,73	0,502	1687,7	2,151	785	470,0	0,563
1,0 mg/l	1,44	0,441	1589,2	1,814	876	430,8	0,472

Tras cambiar los biorreactores al modo en quimiostato, se hicieron crecer los cultivos en condiciones de cultivo continuo durante aproximadamente una semana (semana 2) usando los medios con diferentes complementaciones con cinc, tal como se describió anteriormente. Se tomaron semanalmente muestras del sobrenadante de los biorreactores y se analizaron para determinar la producción de proteína A13 mediante ELISA y la actividad de A13 mediante ensayo de FRETS-VWF73. Similar a los resultados observados para cultivos hechos crecer en el modo semicontinuo, la complementación del medio de crecimiento usado para cultivo continuo hecho crecer con cinc adicional dio como resultado la mejora sustancial de actividades específicas de A13 (697 mU/μg y 729 mU/μg para la complementación con ZnSO₄·7H₂O 0,5 mg/l y 1,0 mg/l, respectivamente) tras una semana, en comparación con ausencia de complementación (553 mU/μg) (tabla 17, tabla 18 y tabla 19).

Anteriormente, se había observado que la actividad específica de A13 expresada en cultivo celular continuo mejoró realmente a lo largo de un periodo de tiempo prolongado (véase el ejemplo 3). Para investigar si este resultado podía repetirse o no, los cultivos hechos crecer en medio complementado con cinc adicional se continuaron durante una semana adicional. Tal como se observa en la tabla 18 y la tabla 19, la actividad específica de A13 en los sobrenadantes de ambos cultivos aumentaron de nuevo a lo largo del tiempo. La actividad específica de A13 encontrada en el sobrenadante del medio complementado con ZnSO₄·7H₂O 0,5 mg/l aumentó desde 697 mU/mg en la semana 2 hasta 759 mU/mg en la semana 3 (tabla 18). De manera similar, la actividad específica de A13 encontrada en el sobrenadante del medio complementado con ZnSO₄·7H₂O 1,0 mg/l aumentó desde 729 mU/mg en la semana 2 hasta 812 mU/mg en la semana 3 (tabla 19). Como anteriormente, el crecimiento celular específico no se vio afectado por la complementación con cinc adicional. Sin embargo, de manera notable, la producción de proteína A13 parecía aumentar en ambos cultivos complementados con cinc adicional en comparación con la producción en cultivos no complementados con cinc.

Tabla 17. Datos de fermentación para experimentos de cultivo celular en quimiostato sin complementación de cinc adicional.

Semana de cultivo en quimiostato n.º	Concentración celular	Tasa de crecimiento específica	Tasa de dilución	FRETS de A13	ELISA de A13	Actividad específica	Rendimiento de FRETS	Rendimiento de A13
	[10 ⁶ células/ml]	[1/d]	[1/d]	[mU/ml]	[μg/ml]	[mU/μg]	[U/l/d]	[mg/l/d]
2	1,25	0,340	0,339	1091,8	1,973	553	370,1	0,669

Tabla 18. Datos de fermentación para experimentos de cultivo celular en quimiostato con complementación de cinc adicional de 0,5 mg/l.

Semana de cultivo en quimiostato n.º	Concentración celular	Tasa de crecimiento específica	Tasa de dilución	FRETS de A13	ELISA de A13	Actividad específica	Rendimiento de FRETS	Rendimiento de A13
	[10 ⁶ células/ml]	[1/d]	[1/d]	[mU/ml]	[μg/ml]	[mU/μg]	[U/l/d]	[mg/l/d]
2	1,37	0,350	0,341	1725,5	2,476	697	588,4	0,844
3	1,37	0,362	0,353	1971,7	2,597	759	696,0	0,917

Tabla 19. Datos de fermentación para experimentos de cultivo celular en quimiostato con complementación de cinc adicional de 1,0 mg/l.

Semana de cultivo en quimiostato n.º	Concentración celular	Tasa de crecimiento específica	Tasa de dilución	FRETS de A13	ELISA de A13	Actividad específica	Rendimiento de FRETS	Rendimiento de A13
	[10 ⁶ células/ml]	[1/d]	[1/d]	[mU/ml]	[μg/ml]	[mU/μg]	[U/l/d]	[mg/l/d]
2	1,21	0,327	0,340	1681,7	2,307	729	571,8	0,784
3	1,21	0,330	0,353	1892,2	2,331	812	667,9	0,823

Ejemplo 5

Se realizaron experimentos de experimentos de cultivo celular en quimiostato y semicontinuo usando cultivos en biorreactor de la línea celular CHO recombinante n.º F6 que expresa ADAMTS13 humana en medio BACD-A13 definido químicamente. Se investigó el efecto de complementar el medio de cultivo con niveles superiores de cinc.

5 Se adaptaron células CHO recombinantes que expresan ADAMTS13 humana a un medio registrado definido químicamente, medio BCS, en modo semicontinuo. Se subclonaron las poblaciones adaptadas y se derivó un clon n.º F6 a partir de las mismas.

10 En resumen, se descongeló DWCB#19 y se preparó el inóculo celular en medio BCS. Se transfirieron las células a tres biorreactores de 1,5 l con impulsores de paletas y en medio BACD-A13 registrado complementado con ZnSO₄·7H₂O 1,0 mg/l, 2,0 mg/l y 3,0 mg/l para concentraciones finales de ZnSO₄·7H₂O 1,432 mg/l, 2,432 mg/l y 3,432 mg/l, respectivamente. Se hicieron crecer los cultivos a un pH controlado en línea de 7,15 a 36 °C con una concentración de oxígeno disuelto del 20 % de saturación de aire.

15 Se hicieron crecer los cultivos en modo discontinuo repetido (3 lotes) durante aproximadamente una semana y se sometió a ensayo el sobrenadante para determinar la producción de proteína A13 y la actividad de FRETs-VWF73. Entonces se cambiaron los tres biorreactores al modo de cultivo en quimiostato y se hicieron funcionar durante 10 días en condiciones de cultivo continuo usando los medios con diferentes complementaciones con cinc, tal como se describió anteriormente.

20 En las condiciones de cultivo semicontinuo, la complementación de los medios de cultivo con cantidades crecientes de cinc aumentó adicionalmente la actividad específica de A13 secretada en los sobrenadantes de cultivo. Consecuente con los resultados previos notificados anteriormente, la complementación del medio con ZnSO₄·7H₂O 1,0 mg/l adicional dio como resultado una actividad específica alta de 806 mU/μg. Aumentos adicionales en la concentración de cinc, es decir complementación con 2,0 mg/l y 3,0 mg/l, dieron como resultado niveles incluso superiores de actividad de A13 específica (880 mU/μg y 889 mU/μg, respectivamente) (tabla 20). Como anteriormente, otros parámetros, incluyendo la producción de proteína A13 total y el crecimiento celular específico, no se vieron afectados por la complementación con cinc adicional.

30 Tabla 20. Datos de fermentación para experimentos discontinuos con complementación de cinc adicional (datos medios de 3 lotes).

Cinc adicional	Concentración celular	Tasa de crecimiento específica	FRETs de A13	ELISA de A13	Actividad específica	Rendimiento de FRETs	Rendimiento de A13
	[10 ⁵ células/ml]	[1/d]	[mU/ml]	[μg/ml]	[mU/μg]	[U/l/d]	[mg/l/d]
1,0 mg/l	1,78	0,592	1666,6	2,074	806	633,8	0,687
2,0 mg/l	1,68	0,596	1678,0	1,883	880	621,8	0,619
3,0 mg/l	1,55	0,589	1670,1	1,844	889	580,8	0,625

35 Tras cambiar los biorreactores al modo en quimiostato, se hicieron crecer los cultivos en condiciones de cultivo continuo durante 10 días usando los medios con diferentes complementaciones con cinc, tal como se describió anteriormente. Se analizaron muestras del sobrenadante de los biorreactores para determinar la producción de proteína A13 mediante ELISA y la actividad de A13 mediante ensayo de FRETs-VWF73. A diferencia de los resultados observados para cultivos hechos crecer bajo el modo semicontinuo, la complementación del medio de crecimiento usado para el crecimiento del cultivo continuo con niveles superiores de cinc dio como resultado una disminución en la tasa de crecimiento específica y la viabilidad celular global. El crecimiento del cultivo en quimiostato en medio complementado con ZnSO₄·7H₂O 1,0 mg/l adicional siguió presentando una alta viabilidad celular (88,6 %) y una tasa de crecimiento específico (0,256 al día) (tabla 21) consecuente con los resultados previos descritos anteriormente.

45 En cambio, los cultivos hechos crecer en medios complementados con niveles superiores de ZnSO₄·7H₂O, 2,0 mg/l y 3,0 mg/l, presentaron reducciones significativas en los niveles de viabilidad celular (el 72,1 % y el 80,4 %, respectivamente) y las tasas de crecimiento específico (0,091 y 0,134 al día, respectivamente). Sin embargo, de manera notable, la actividad específica de A13 en los dos sobrenadantes de cultivo permaneció alta (863 mU/μg y 771 mU/μg, respectivamente) (Tabla 21).

50 Tabla 21. Datos de fermentación para experimentos de cultivo celular en quimiostato con complementación de cinc adicional.

Cinc adicional	Concentración celular	Tasa de crecimiento	Tasa de dilución	Viabilidad celular	FRETs de A13	ELISA de A13	Actividad específica	Rendimiento de FRETs	Rendimiento de A13	Consumo de glucosa

		especí- fica								
	[10 ⁶ células/ ml]	[1/d]	[1/d]	[%]	[mU/ml]	[µg/ml]	[mU/µg]	[U/l/d]	[mg/l/d]	[g/L/d]
1,0 mg/l	1,28	0,256	0,336	88,6	2716,0	3,127	868	911,5	1,050	1,21
2,0 mg/l	0,55	0,091	0,321	72,1	1408,9	1,632	863	452,7	0,524	0,58
3,0 mg/l	0,56	0,134	0,321	80,4	1359,8	1,763	771	436,5	0,566	0,64

Ejemplo 6

5 Se expresó la proteína A13 humana en la línea celular CHO recombinante n.º 640-2 en un medio BACDA13 definido químicamente complementado con cinc adicional y nicotinamida en biorreactores de 50 l. Tras recoger los sobrenadantes de los cultivos, se realizó una comparación de las etapas de ultra/diafiltración (50 kD) usando tampones con y sin cinc y calcio.

10 Se adaptaron células CHO recombinantes que expresan ADAMTS13 humana a un medio registrado definido químicamente, medio BCS. En resumen, se descongeló un DWCB y se preparó el inóculo celular en medio BCS. Se transfirieron las células por medio de un biorreactor de 10 l a un biorreactor de 50 l con impulsores de tipo Rushton y se cultivaron en modo en quimiostato en medio BACD-A13 registrado a un pH controlado en línea de 7,15-7,20 a 37 °C con una concentración de oxígeno disuelto del 20 % de saturación de aire.

15 Se filtraron los sobrenadantes de los biorreactores y se ultrafiltraron las cosechas libres de células usando una membrana de PES de 50 kD (factor de concentración de aproximadamente 1:10) y luego se diafiltraron con 5 volúmenes de un tampón que contenía NaCl 50 mM y TRIS 20 mM a pH 7,7. Se comparó el tampón de diafiltración con o sin Ca 2 mM y Zn 5 µM para determinar el efecto sobre la pérdida de actividad entre la diafiltración y la purificación cromatográfica.

20 Se determinaron las actividades específicas, registradas como mU de FRET5-WWF73 por µg de A13 detectadas mediante ELISA, inmediatamente después de la diafiltración y justo antes de cargar la muestra para su purificación adicional. Se almacenaron las muestras a entre aproximadamente 2 y 8 °C durante un tiempo máximo de 3 días (aproximadamente menos de 80 horas). Cuando se almacenaron las muestras durante periodos de tiempo más prolongados, se mantuvieron a menos de -15 °C entre el final de la diafiltración y el comienzo de la cromatografía. Se midieron las muestras y se compararon inmediatamente después de la diafiltración y justo antes de cargar la columna cromatográfica.

30 A pesar del tiempo de espera relativamente corto entre las etapas de ultra/diafiltración y las etapas de purificación adicionales, se produjo una pérdida significativa de actividad específica de A13 (23,3 %) cuando el tampón de diafiltración carecía de cinc y calcio. En cambio, cuando el tampón de diafiltración que se usó contenía Ca 2 mM y Zn 5 µM, la pérdida de actividad específica de A13 (7,3 %) se redujo enormemente (tabla 22).

Tabla 22. Resultados de los experimentos de diafiltración usando tampón de diafiltración con y sin calcio y cinc.

Muestra	Diafiltración	Actividad específica tras la filtración	Actividad específica en carga de purificación	% de pérdida de actividad
1	sin Ca/Zn	999	740	25,9
2	sin Ca/Zn	924	734	20,6
Media	sin Ca/Zn	962	737	23,3
Desv. est.	sin Ca/Zn	53	4,2	N/A
3	con Ca/Zn	849	835	1,6
4	con Ca/Zn	951	985	-3,6
5	con Ca/Zn	929	877	5,6
6	con Ca/Zn	1131	844	25,4
Media	con Ca/Zn	965	885	7,3
Desv. est.	con Ca/Zn	119	68,9	N/A

Ejemplo 7

40 Se compararon los procedimientos de cultivos celular continuo en perfusión y en quimiostato para determinar la producción relativa y las actividades específicas de A13 expresadas en varias líneas celulares CHO recombinantes.

En resumen, se adaptaron diferentes clones de células CHO recombinantes que expresan A13 humana recombinante a un medio registrado definido químicamente (BCS), que se usó para la preparación de inóculos. Se cultivaron adicionalmente las células en cultivos en biorreactor en medio BACD-A13 registrado complementado con

cinc y nicotinamida a concentraciones finales de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,432 mg/l y nicotinamida 7,02 mg/l. Se transfirieron entonces inóculos de cada clon celular a dos biorreactores, de los cuales uno se cultivó en condiciones quimiostáticas (CST) y el otro bajo perfusión, tal como se indica en la tabla 23. Se cultivaron las células a una densidad de entre aproximadamente 2×10^6 y 4×10^6 células/ml en microvehículos Cytopore™ II (GE Biosciences).

Se hicieron crecer los cultivos en condiciones de cultivo continuo durante de 3 a 4 semanas y se analizaron de manera periódica muestras del sobrenadante de los biorreactores para determinar la producción de proteína A13 mediante ELISA y la actividad de A13 mediante ensayo de FRET-S-VWF73. Los valores proporcionados en la tabla 23 representan promedios para el periodo de 3 a 4 semanas. Consecuente con los resultados obtenidos en los ejemplos 1 a 6 anteriormente, los cultivos hechos crecer en condiciones quimiostáticas produjeron de aproximadamente 1 mg/l/d a aproximadamente 2 mg/l/d de proteína A13 que tenía actividades específicas altas de aproximadamente 700 mU/ μg a aproximadamente 1000 mU/ μg (tabla 23). Sorprendentemente, los cultivos hechos crecer en condiciones de cultivo en perfusión demostraron de manera constante niveles de actividad y producción de proteína de A13 mayores en el sobrenadante de cultivo que los clones idénticos hechos crecer en condiciones quimiostáticas. Las actividades específicas para A13 producida en los cultivos de perfusión eran muy altas, demostrando tres de los cuatro clones al menos aproximadamente 1.000 mU/ μg .

Tabla 23. Resultados de los experimentos que comparan el cultivo celular en perfusión y en quimiostato.

Clon	Volumen	Modo	Actividad específica	Rendimiento de FRET-S	Rendimiento de A13
	[l]		[mU/ μg]	[U/l/d]	[mg/l/d]
F6	50,0	CST	800	800	1,0
F6	10,0	Perfusión	1.000	1.600	1,6
D6	1,5	CST	690	900	1,3
D6	1,5	Perfusión	890	1.700	1,9
X1	1,5	CST	1.040	2.400	2,3
X1	1,5	Perfusión	1.000	2.600	2,6
E2	1,5	CST	710	500	0,7
E2	1,5	Perfusión	1.000	1.600	1,6

Ejemplo 8

Con el fin de determinar el efecto de la temperatura y el pH sobre la producción de proteína ADAMTS13 humana recombinante sembrada en cultivo de células eucariotas usando un medio de cultivo libre de proteínas animales definido químicamente, se hicieron crecer los cultivos a temperaturas de entre 35,0 °C y 38,0 °C a pH de entre 7,05 y 7,30.

En resumen, se transfirieron células CHO recombinantes que expresan A13 humana a biorreactores de 1,5 l con impulsores de paletas, en medio BACD-A13 registrado. Se hicieron crecer los cultivos a pH controlados en línea de entre 7,05 y 7,30 a temperaturas que oscilaban entre 35,0 °C y 38,0 °C con una concentración de oxígeno disuelto del 20 % de saturación de aire. Se diseñaron y ejecutaron los experimentos usando el enfoque de superficie de respuesta. Se realizó el análisis estadístico usando el paquete de software estadístico Minitab® 15.1.0.0.

Se tomaron muestras de los biorreactores y se analizaron para determinar A13 mediante ELISA, se midió la actividad de A13 mediante ensayo de FRET-S-VWF73. Se determinaron los recuentos celulares mediante la tecnología Nucleocounter. Se midieron las tasas de dilución y se usaron para el cálculo de las tasas de crecimiento y las productividades volumétricas.

Tal como puede observarse en las figuras 1 y 2, tanto la temperatura como el pH tuvieron un efecto sustancial sobre la productividad de A13 volumétrica (medida mediante FRET-S-VWF73, figura 1), y la actividad específica (actividad de FRET-S-VWF73 / antígeno mediante ELISA, figura 2). Específicamente, se logró la productividad de FRET-S volumétrica máxima en cultivos hechos crecer en un intervalo de pH inferior de entre aproximadamente 7,05 y 7,2, especialmente de aproximadamente 7,10 y temperaturas de entre aproximadamente 35,0 °C y 37,0 °C, especialmente de aproximadamente 36 °C. Específicamente, se logró la actividad específica máxima (FRET-S-VWF73 frente a antígeno mediante ELISA) en cultivos hechos crecer en un intervalo de pH inferior de entre aproximadamente 7,05 y 7,2, especialmente por debajo de 7,10 y temperaturas de entre aproximadamente 35,0 °C y 37,0 °C, especialmente por debajo de 36 °C. Específicamente, se lograron condiciones óptimas para la producción de A13 con una combinación de una temperatura de aproximadamente 36 °C y un pH de aproximadamente 7,10 en cuanto a calidad de producto y rendimiento óptimos.

Se entiende que los ejemplos y las realizaciones descritas en el presente documento son para fines ilustrativos únicamente y que a la luz de los mismos los expertos en la técnica darán lugar a diversas modificaciones o cambios que se incluirán dentro del espíritu y ámbito de la presente solicitud y el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para expresar una proteína desintegrina y metaloproteínasa con motivos de trombospondina (ADAMTS), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS en un medio de cultivo que comprende cinc a una concentración de entre 2 μM y 12 μM .
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo contiene cinc al menos 5 μM .
- 10 3. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el medio de cultivo contiene calcio al menos 0,5 mM, preferentemente calcio entre 0,5 mM y 1,5 mM.
- 15 4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el medio de cultivo comprende además nicotinamida (vitamina B3) al menos 2 mg/l, preferentemente nicotinamida (vitamina B3) al menos 7 g/l.
- 20 5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el medio de cultivo comprende además poliamina al menos 0,5 mg/l.
6. El procedimiento según la reivindicación 5, en el que la poliamina es putrescina.
7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el medio de cultivo está libre de proteínas animales.
- 25 8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el medio de cultivo está definido químicamente.
- 30 9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la célula es una célula de mamífero, y en el que la célula de mamífero es una línea celular seleccionada del grupo que consiste en una línea celular humana, una línea celular de hámster y una línea celular murina.
10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el procedimiento comprende cultivo celular continuo.
- 35 11. El procedimiento según la reivindicación 10, en el que el cultivo celular continuo comprende cultivo celular en suspensión continua.
- 40 12. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, en el que el cultivo se mantiene durante al menos 7 días.
- 45 13. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la proteína ADAMTS es ADAMTS13.
14. El procedimiento según la reivindicación 13, en el que la actividad específica de la proteína ADAMTS13 en el medio de cultivo es de al menos 600 U por mg de proteína ADAMTS13.
- 50 15. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, en el que el cultivo produce al menos 400 U de actividad de ADAMTS13 por l de cultivo al día (U/l/d).
- 55 16. Un procedimiento para producir una composición de ADAMTS, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
 - (a) cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS en un medio de cultivo libre de proteínas animales;
 - (b) retirar una fracción del sobrenadante del cultivo;
 - (c) realizar una etapa de filtración o centrifugación para retirar cualquier célula residual;
 - 60 (d) realizar una etapa de ultrafiltración para concentrar la proteína ADAMTS; y
 - (e) realizar una etapa de diafiltración con un tampón que comprende cinc al menos 0,5 μM y calcio al menos 0,1 mM; preparando de ese modo una composición de ADAMTS;
 - 65 en el que el medio de cultivo contiene cinc entre 2 μM y 12 μM .

17. El procedimiento según la reivindicación 16, en el que la proteína ADAMTS es ADAMTS13.
 18. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 17, en el que menos del 20 % de la actividad específica de ADAMTS13 se pierde entre el final de la etapa (c) y el final de la etapa (e).
- 5

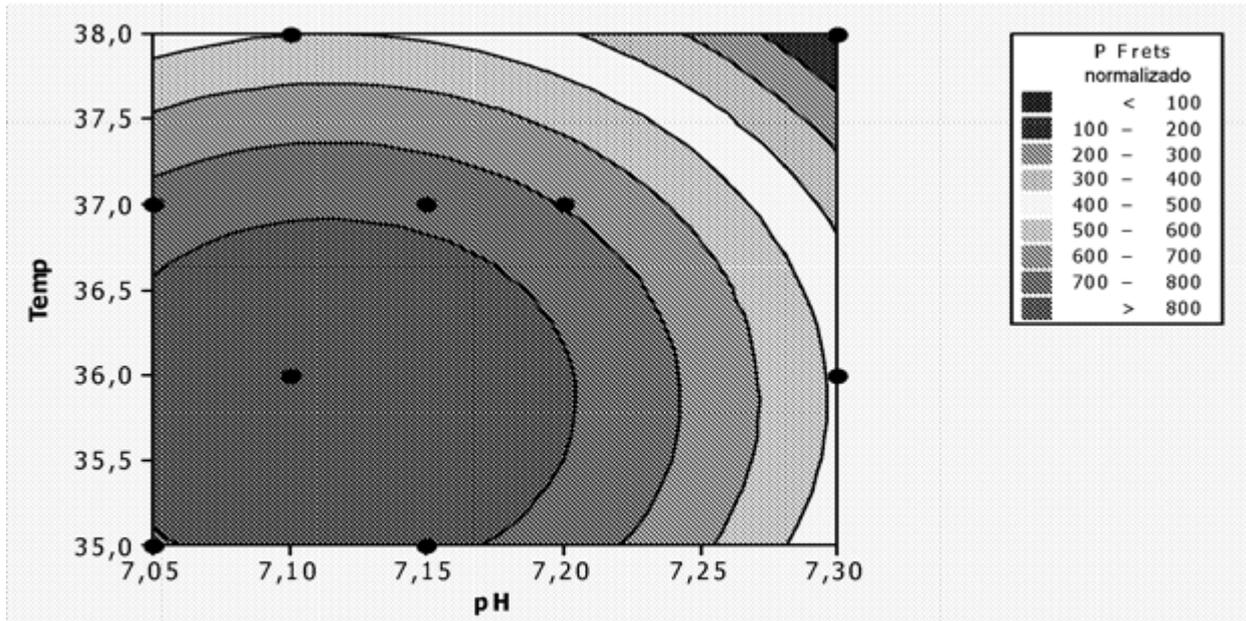


FIG. 1A

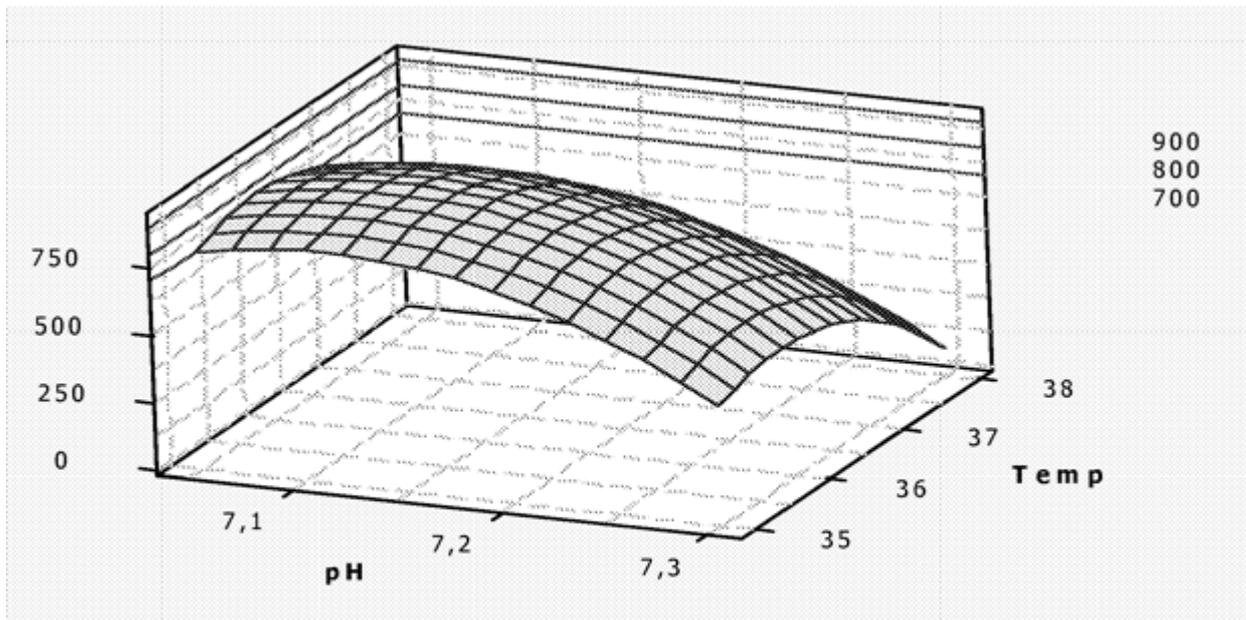


FIG. 1B

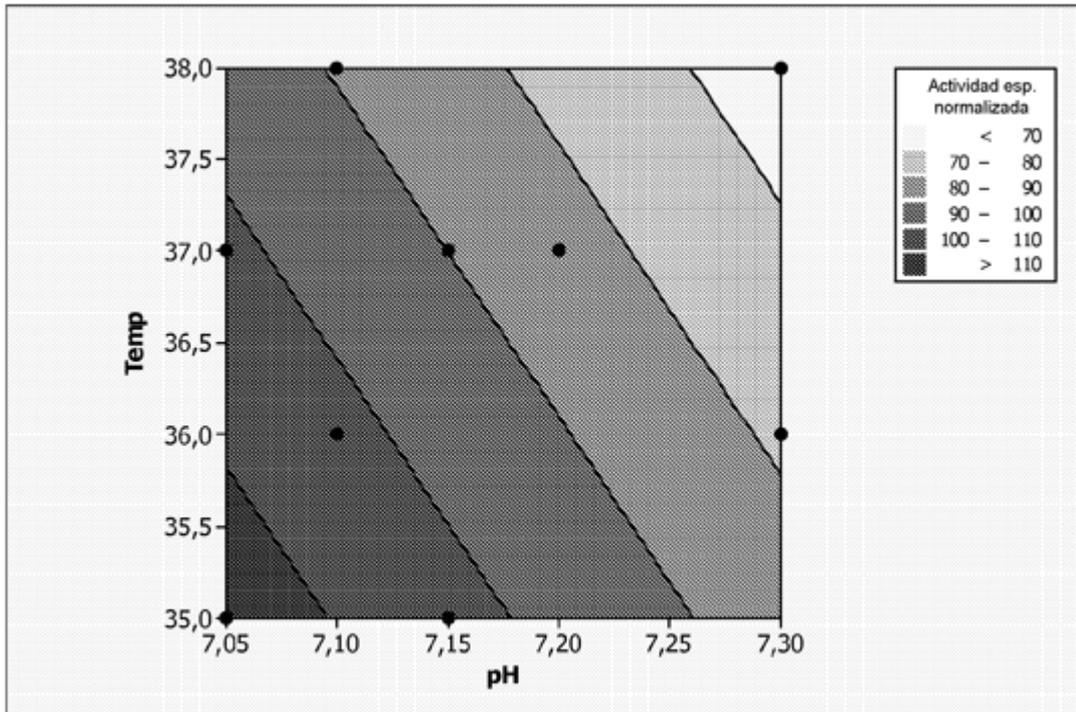


FIG. 2A

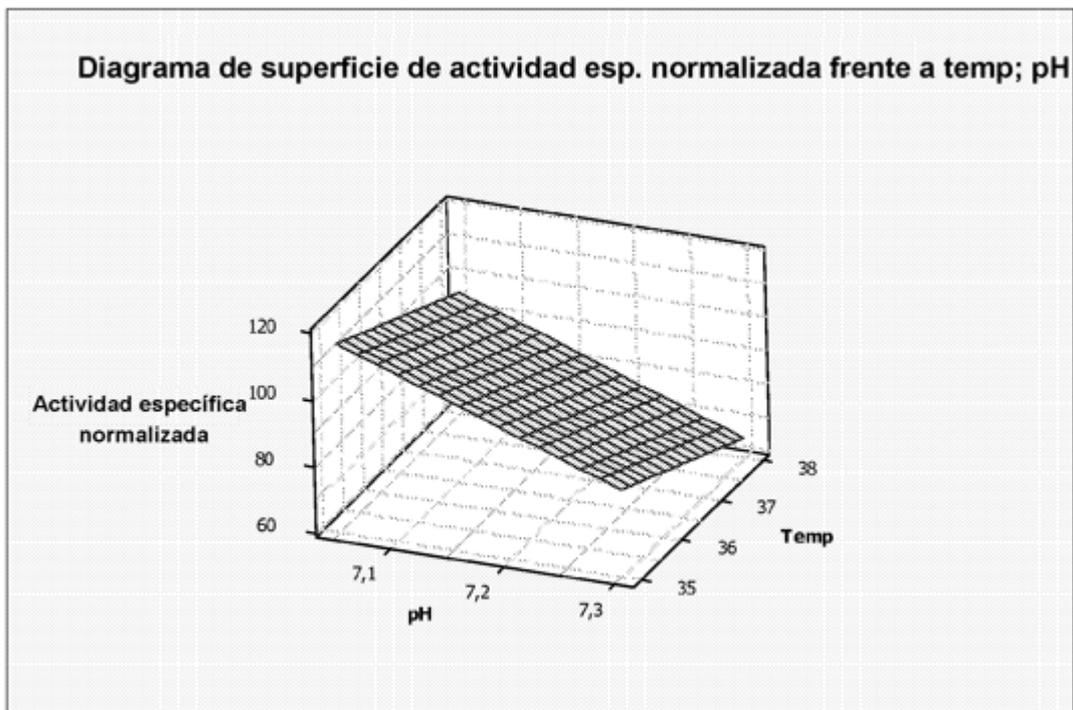


FIG. 2B